

UNIVERSIDADE DE CAXIAS DO SUL

**PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
COORDENADORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO**

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

**AVALIAÇÃO DA TÉCNICA DE ELETRODIÁLISE PARA A SEPARAÇÃO
DE ÁCIDO LACTOBÍÔNICO PRODUZIDO POR VIA
BIOTECNOLÓGICA**

Fabiola Andreola Peretti

**Caxias do Sul
2006**

Fabíola Andreola Peretti

**AVALIAÇÃO DA TÉCNICA DE ELETRODIÁLISE PARA A SEPARAÇÃO
DE ÁCIDO LACTOBIÔNICO PRODUZIDO POR VIA
BIOTECNOLÓGICA**

“Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul, visando a obtenção de grau de Mestre em Biotecnologia”

Orientador: Prof. Dr. Mauricio Moura da Silveira

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Mára Zeni Andrade

**Caxias do Sul
2006**

Fabíola Andreola Peretti

**AVALIAÇÃO DA TÉCNICA DE ELETRODIÁLISE PARA A SEPARAÇÃO
DE ÁCIDO LACTOBÍÔNICO PRODUZIDO POR VIA
BIOTECNOLÓGICA**

“Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul, visando a obtenção de grau de Mestre em Biotecnologia”

Orientador: Prof. Dr. Mauricio Moura da Silveira

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Mára Zeni Andrade

Prof. Dr. Mauricio Moura da Silveira

Prof^a. Dr^a. Mára Zeni Andrade

Prof^a. Dr^a. Isabel Cristina Tessaro

Prof. Dr. Marco Di Luccio

Prof^a. Dr^a. Adriana Escalona Gower

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a toda minha família e amigos pelo apoio e incentivo, não só durante a realização deste trabalho, mas em todos os momentos da minha vida. Muito obrigada aos meus pais Helena e Jordano, a Ale, a Tita, a Ângela e ao Maurício, pela força e amizade.

Agradeço em especial ao Prof. Dr. Maurício Moura da Silveira e a Prof^ª. Dr^ª. Mara Zeni Andrade pela orientação e inestimável ajuda que recebi.

À Prof^ª. Dr^ª. Isabel Cristina Tessaro do Departamento de Engenharia Química da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) e ao Prof. Marco Di Luccio do Departamento de Engenharia de Alimentos da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões (URI) do campus de Erechim, pelas contribuições e pela disposição de comparecerem à banca.

Aos Prof. Dr. Aldo José Pinheiro Dillon, à Prof^ª. Dr^ª. Adriana Escalona Gower e *in memoriam* ao Prof. Dr. Raul Alberto Riveros pela colaboração.

Ao Laboratório de Processos Biotecnológicos II em especial à Eloane, Sabrina, Flávia e ao Tomas pela grande ajuda.

Ao Laboratório de Química do Departamento de Física e Química da Universidade de Caxias do Sul (UCS) e aos grandes colegas e amigos por todo apoio e companheirismo, em especial a Gabi e ao Israel.

Ao Laboratório de Referência Enológica (LAREN), em especial à Prof^ª. Dr^ª. Regina Vanderlinde, a Laurien e a Sandra pela contribuição imprescindível.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia pelo conhecimento adquirido e aos meus colegas pela amizade.

Ao Laboratório de Eletrônica da Universidade de Caxias do Sul pelo empréstimo do equipamento.

A Deus, pela força, por não me deixar desanimar e por permitir que eu chegasse até aqui.

A todos que colaboraram de alguma forma e que não foram listados, o meu agradecimento.

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO.....	xv
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	xvii
2.1. Produção biotecnológica de ácido lactobiônico e sorbitol.....	xvii
2.2. Eletrodialise (ED).....	xxiii
2.2.1. Membranas íon-seletivas.....	xxvi
2.2.2. Polarização por concentração.....	xxx
2.2.3. Aplicações do processo de eletrodialise.....	xxxii
3.MATERIAL E MÉTODOS.....	xxxviii
3.1. Produção do ácido lactobiônico.....	xxxviii
3.1.1. Microrganismo.....	xxxviii
3.1.2. Meio de cultura básico.....	xxxviii
3.1.3. Cultivos celulares para produção de enzimas.....	xxxix
3.1.4. Permeabilização e imobilização das células de <i>Zymomonas mobilis</i>	xxxix
3.1.5. Bioconversão de frutose e lactose em sorbitol e ácido lactobiônico.....	xl
3.2. Separação do ácido lactobiônico por eletrodialise.....	xli
3.2.1. Sistema de eletrodialise.....	xli
3.2.2. Membranas utilizadas nos ensaios de eletrodialise.....	xliii
3.2.3. Soluções.....	xliii
3.2.4. Métodos analíticos.....	xliv
4.RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	xlvi
4.1. Avaliação preliminar do sistema de eletrodialise para a separação de ácido lactobiônico.....	xlvi
4.2. Avaliação do sistema de eletrodialise com densidade de corrente constante.....	l
4.3. Avaliação do sistema de eletrodialise com diferença de potencial constante.....	liii
4.4. Aplicação do sistema de eletrodialise na separação do ácido lactobiônico das demais substâncias presentes no processo de bioconversão.....	lxii

5.CONCLUSÕES.....lxvii

6.REFERÊNCIAS.....lxix

AnexoLxxiv

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Mecanismo de formação do etanol, sorbitol e gliconato a partir de glicose e frutose pela bactéria *Z. mobilis* (Silveira & Jonas, 2002)..... xviii**
- Figura 2: Esquema da rota empregada pela *Z. mobilis* na produção de sorbitol e ácido glicônico com células permeabilizadas (Ferraz, 1999)..... xix**
- Figura 3: Estrutura química do ácido lactobiônico (Kansai Window, 2002)..... xx**
- Figura 4: Velocidade específica de formação do ácido lactobiônico em relação à variação da concentração de frutose e lactose, com concentração celular de 4g.L-1, temperatura de 39°C; pH 6,4 e tempo de reação de 30min..... xxi**
- Figura 5: Variação da concentração de ácido lactobiônico e da produtividade em função do tempo para concentração inicial de lactose e frutose de 0,7mol.L-1; concentração celular de 25g.L-1; temperatura de 39°C e pH 6,4..... xxi**
- Figura 6: Princípio da transferência dos íons no processo de eletrodialise (Rautenbach et al., 1989)..... xxv**
- Figura 7: Arranjo iônico na matriz polimérica de uma membrana de troca iônica catiônica (Strathmann, 2001)..... xxviii**
- Figura 8: Esquema do processo de eletrodialise com membranas bipolares. AC (membrana bipolar), A (membrana aniônica) e C (membrana catiônica) para formação de ácido láctico e NaOH (Reimann, 2005)..... xxix**
- Figura 9: Biorreator Biostat B – B. Braun Biotech utilizado para a produção de biomassa celular e enzimas..... xxxix**
- Figura 10: Esquema da dissociação dos íons em um sistema de eletrodialise de três compartimentos com solução de ácido lactobiônico na forma de seu sal sódico. (A) compartimento anódico, (C) compartimento catódico e (I) compartimento intermediário. xli**

Figura 11: Sistema completo de eletrodialise utilizado na separação de ácido lactobiônico. (A) fonte de força eletromotriz (fem), (B) agitador magnético, (C) sistema de eletrodialise de três compartimentos e (D) condutivímetro..... xlii

Figura 12: Condutividade elétrica e concentração de NaCl no compartimento de alimentação em função do tempo para um ensaio de eletrodialise com NaCl 36g.L-1 no compartimento intermediário e NaCl 20g.L-1 nos compartimentos anódico e catódico, para um potencial constante de 15V..... xlvii

Figura 13: Condutividade elétrica em função da concentração de ácido lactobiônico cristalizado (1, 5, 10, 20, 30, 50 e 100g.L-1)..... xlviii

Figura 14: Condutividade elétrica em função do tempo para um ensaio de eletrodialise com uma solução de ácido lactobiônico cristalizado (20g.L-1) em comparação ao ácido lactobiônico comercial (20g.L-1) e gliconato de sódio p.a. (20g.L-1), para um potencial constante de 15V..... xlix

Figura 15: Condutividade elétrica em função do tempo para um ensaio de eletrodialise com solução de ácido lactobiônico cristalizado (20g.L-1) e corrente constante de 49mA..... li

Figura 16: Condutividade elétrica em função do tempo para um ensaio de eletrodialise com solução de ácido lactobiônico cristalizado (20g.L-1) e corrente constante de 46mA..... lii

Figura 17: Concentração no compartimento intermediário e anódico em função do tempo para um ensaio de eletrodialise com solução de ácido lactobiônico cristalizado (20g.L-1) e corrente constante de 46mA..... lii

Figura 18: Condutividade elétrica da solução de ácido lactobiônico cristalizado (20g.L-1) em função do tempo para um ensaio de eletrodialise com potencial constante de 5, 15, 30 e 60V. liv

Figura 19: Condutividade elétrica da solução de ácido lactobiônico cristalizado nas concentrações 1, 5, 10, 20 e 30g.L-1, em função do tempo para um ensaio de eletrodialise com potencial constante de 15V..... lv

Figura 20: Condutividade elétrica da solução de ácido lactobiônico cristalizado nas concentrações 1, 5, 10, 20 e 30g.L-1, em função do tempo para um ensaio de eletrodialise com potencial constante de 30V..... lvi

Figura 21: Condutividade elétrica da solução de ácido lactobiônico cristalizado nas concentrações 1, 5, 10, 20 e 30g.L-1, em função do tempo para um ensaio de eletrodialise com potencial constante de 60V..... lvi

Figura 22: Velocidade máxima de redução da condutividade em função da concentração da solução de ácido lactobiônico cristalizado (1, 5, 10, 20 e 30g.L-1) para um ensaio de eletrodialise com potencial aplicado de 15V em comparação a 30 e 60V.....lvii

Figura 23: Ácido lactobiônico recuperado no compartimento anódico em função dos potenciais (15, 30 e 60V) para um ensaio de eletrodialise com uma solução de ácido lactobiônico cristalizado nas concentrações (1, 5, 10, 20 e 30g.L-1) em 400min.....lviii

Figura 24: Resistência elétrica aparente do sistema de eletrodialise com solução de ácido lactobiônico 20g.L-1, na condição de potencial constante de 15V em comparação a 30 e 60V. lix

Figura 25: Ácido lactobiônico no compartimento intermediário em função do tempo para um ensaio de eletrodialise com uma solução de ácido lactobiônico cristalizado (20g.L-1) e potencial constante de 15V e 30V.....lix

Figura 26: Ácido lactobiônico recuperado no compartimento anódico em função do tempo para um ensaio de eletrodialise com uma solução de ácido lactobiônico cristalizado (20g.L-1) e potencial constante de 15V e 30V.....lx

Figura 27: Condutividade elétrica em função do tempo para um ensaio de eletrodialise com uma solução de ácido lactobiônico cristalizado (20g.L-1), potencial de 30V e com diferentes volumes do compartimento anódico (120 e 300mL)..... lxi

Figura 28: Condutividade elétrica em função do tempo para um ensaio de eletrodialise com solução de ácido lactobiônico cristalizado e lactose, ácido lactobiônico cristalizado e frutose, ácido lactobiônico cristalizado e sorbitol e com todos os componentes da bioconversão,

todos 20g.L-1, em comparação a uma solução de ácido lactobiônico cristalizado 20g.L-1 com potencial constante de 15V..... lxii

Figura 29: Condutividade elétrica em função do tempo para um ensaio de eletrodialise com meio de bioconversão (165g.L-1) e potencial constante de 15V em 350min.....lxv

Figura 30: Concentração de ácido lactobiônico, lactose, frutose e sorbitol no compartimento anódico em função do tempo para um ensaio de eletrodialise com bioconversão (165g.L-1) e potencial constante de 15V em 350min.....lxv

LISTA DE QUADROS

- Quadro 1: Caracterização dos processos de separação por membranas (Maldonado, 1991).
xxiv**
- Quadro 2: Características das membranas comerciais íon-seletivas (Scott, 1995)..... xxvii**
- Quadro 3: Aplicações industriais do processo de eletrodialise (Strathmann, 2001)..... xxxiii**
- Quadro 4: Características das membranas comerciais Ionics®..... xliii**

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1: Concentração e recuperação no compartimento anódico em um ensaio de eletrodialise com uma solução de ácido lactobiônico cristalizado (ALC) em comparação ao ácido lactobiônico comercial (AL) e ao gliconato de sódio p.a. (GS), em concentrações de 20g.L-1, para um potencial constante de 15V..... xlix**
- Tabela 2: Concentração e recuperação de ácido lactobiônico (AL) no compartimento anódico em ensaio de eletrodialise com solução de ácido lactobiônico cristalizado (20g.L-1) e diferença de potencial (ddp) constante de 5, 15, 30 e 60V.....liv**
- Tabela 3: Ácido lactobiônico (AL) recuperado no compartimento anódico em um ensaio de eletrodialise com solução de ácido lactobiônico cristalizado (ALC) e lactose (LACT), ácido lactobiônico cristalizado e frutose (FRUT), ácido lactobiônico cristalizado e sorbitol**

(SORB) e com todos os componentes da bioconversão, na concentração de 20g.L-1, em comparação a uma solução de ácido lactobiônico cristalizado 20g.L-1 com potencial constante de 15V.....lxiii

NOMENCLATURA

AL - ácido lactobiônico

ALC - ácido lactobiônico cristalizado (padrão)

ddp - diferença de potencial elétrico aplicado

ED - eletrodialise

EDB - eletrodialise com membrana bipolar

EDR - eletrodialise reversa

GFOR - glicose-frutose oxidoreductase

GL - glicono- δ -lactonase

GS - gliconato de sódio

HPLC - cromatografia em fase líquida

M – molaridade (mol.L^{-1})

MM - massa molar (g.mol^{-1})

N – fluxo molar de ácido lactobiônico permeado através da membrana ($\text{mmol.cm}^{-2}.\text{min}^{-1}$)

NADP - nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato

OI - osmose inversa

r = coeficiente de correlação

R_{ap} - resistência aparente (Ohm)

SSM - meio semi-sintético modificado

t - tonelada

UF - ultrafiltração

v_{mc} - velocidade máxima de redução da condutividade ($\text{mS.cm}^{-1}.\text{min}^{-1}$)

v_{mr} - velocidade máxima de remoção de ácido lactobiônico ($\text{g.L}^{-1}.\text{min}^{-1}$)

RESUMO

As enzimas glicose-frutose oxidorreductase (GFOR) e glicono- δ -lactonase (GL), presentes em células da bactéria *Zymomonas mobilis*, têm a capacidade de catalisar a formação de ácido lactobiônico (AL), ou seus sais, e sorbitol utilizando lactose e frutose como substratos. O AL e o lactobionato de sódio têm importantes aplicações na área médica e na indústria de cosméticos. As enzimas GFOR e GL apresentam suas maiores atividades em pH 6,4, por esta razão, durante a produção do AL há a necessidade de corrigir o pH do meio a fim de mantê-lo em torno deste valor. A separação do ácido lactobiônico por eletrodialise é possível, uma vez que esta substância é o único componente iônico da bioconversão. O processo de remoção do AL durante o processo de formação pode ser vantajoso, pois tornaria desnecessária a adição de base ao meio reacional, além de otimizar e desonerar o processo de purificação. Este trabalho teve como objetivo avaliar a viabilidade da utilização da técnica de eletrodialise (ED) como alternativa para separação do ácido lactobiônico de soluções contendo lactose, frutose e sorbitol, provenientes de processo biotecnológico catalisado pela enzimas GFOR e GL de *Z. mobilis*. Foram utilizadas membranas Ionics[®] aniônica AR204-SZRA e catiônica CR67-HMP com 11cm² de área permeante. Os ensaios foram realizados em um sistema de ED de três compartimentos de 120mL de volume cada. No compartimento intermediário foi alimentada a solução ou o meio de bioconversão contendo o ácido lactobiônico, enquanto os compartimentos anódico e catódico continham solução de NaCl (20g.L⁻¹). A passagem dos eletrólitos através das membranas foi acompanhada indiretamente pela medida da condutividade elétrica e, também, pela concentração de AL e das demais substâncias presentes no meio de bioconversão, as quais foram determinadas por cromatografia em fase líquida (HPLC). Com densidade de corrente elétrica constante, a diferença de potencial (ddp) elétrica aplicada variava ao longo do tempo. Deste modo, a fim de evitar um aumento excessivo da ddp e um conseqüente aumento na resistência elétrica do sistema, que poderia ocasionar uma polarização por concentração, optou-se por operar o sistema com diferença de potencial constante. A melhor condição foi determinada pela variação da ddp (5, 15, 30 e 60V) ao longo do tempo, para diferentes concentrações de ácido lactobiônico (1, 5, 10, 20 e 30g.L⁻¹). A partir dos resultados percentuais de recuperação de AL, da velocidade máxima de redução da condutividade e da resistência aparente do sistema, a melhor ddp para operação do sistema de ED foi determinada em 15V. Nesta condição, a recuperação de ácido lactobiônico cristalizado com solvente orgânico (ALC), utilizado como padrão, presente na concentração de 20g.L⁻¹, foi de 38,7% em 250min de ensaio. Quando comparada a uma solução padrão contendo todos os componentes presentes na bioconversão (lactose, frutose e sorbitol) a

recuperação foi afetada pela presença das substâncias não iônicas e a eficiência de recuperação de ALC decresceu para 16,2%. O mesmo comportamento foi observado quando o teste foi realizado com um meio de bioconversão real diluído e previamente submetido a tratamento de microfiltração para remoção de impurezas, em que a recuperação foi de 14%. Apesar da eficiência relativamente baixa, em razão das limitações do sistema de ED utilizado, os resultados na permeação do ácido lactobiônico podem ser considerados satisfatórios. Maiores eficiências de recuperação poderiam ser obtidas com o aumento da área permeante, seja aumentando a área de membrana ou o número de compartimentos do sistema de eletrodialise. Os resultados sugerem que a recuperação de ácido lactobiônico por eletrodialise, simultaneamente ao processo biotecnológico de produção, pode ser viável uma vez que o custo envolvido com a aplicação desta técnica é justificado pelo alto valor agregado do produto.

ABSTRACT

Glucose-fructose oxidoreductase (GFOR) and glicono- δ -lactonase (GL) enzymes are present in *Zymomonas mobilis* bacteria cells. These enzymes are capable to catalyze lactobionic acid (AL) formation (or formation of its correspondent salts) together with sorbitol from lactose and fructose. Lactobionic acid and sodium lactobionate have important applications in medical area and cosmetic industry. GFOR and GL enzymes present higher activity at pH 6.4, thus being necessary correction of pH medium during AL formation process, in order to maintain pH around 6.4. Lactobionic acid separation using electrodialysis is possible since this acid is the only ionic component in bioconversion. Extraction of AL simultaneously to its formation could be advantageous since addition of alkali to the reaction medium would be unnecessary, besides optimizing and making less expensive the purification process. This work aims to evaluate the technical viability by utilize electrodialysis (ED) technique as an alternative to separate lactobionic acid, from solutions containing lactose, fructose, and sorbitol, produced by biotechnological processes catalyzed by GFOR and GL of *Z. mobilis*. Ionics® membranes were used in this study, with AR204-SZRA specification for anion exchange membrane and CR67-HMP specification for cation exchange membrane, with 11cm² of permeating area for each one. Experiments were performed in a three-compartment ED stack with 120mL of volume each. Intermediate compartment received feed solution or bioconversion medium containing lactobionic acid, whilst anodic and cathodic compartments contained a sodium chloride solution (20gL⁻¹). Electrolytes passage through the membrane was indirectly observed by measuring conductivity in the intermediate compartment. Lactobionic acid concentration, as well as concentration of other substances present in bioconversion medium, was determined by high performance liquid chromatography (HPLC). When using a constant current density, the applied voltage presented variation along the time. Thus, in order to avoid excessive increase of voltage and consequently an increase of electrical resistance of the system – that would result in concentration polarization – it was chosen to operate the system with a constant voltage. The best condition for the system was determined combining different voltages (5, 15, 30 ad 60V) with different lactobionic acid concentrations (1, 5, 10, 20 and 30gL⁻¹). From lactobionic acid recovery results, maximum conductivity decreasing velocity, and apparent resistance of the system, the best voltage for the system operation was determined as 15V. Under this condition, crystallized lactobionic acid (ALC) recovery from a 20gL⁻¹ standard solution was 38.7% in a 250min experiment. When compared to a standard solution containing all bioconversion

components (lactose, fructose and sorbitol) the recovery was affected due to the presence of non-ionic substances, thus ALC recovery efficiency decreased to 16.2%. The same behavior was observed when the test was performed using a real diluted bioconversion medium, previously treated by micro-filtration for removal of impurities. Under these conditions, recovery was 14%. Despite relatively low efficiency due to the limitations of ED system used, the results of lactobionic acid permeation can be considered satisfactory. Higher recovery efficiencies could be obtained by increasing permeating area, either increasing membrane area or increasing the number of compartments in electro dialysis stack. The results suggest that lactobionic acid recovery using electro dialysis simultaneously to the biotechnological process of production can be feasible, since the costs involved with the application of this technique are justified by the added value of the product.

1. INTRODUÇÃO

Sorbitol e ácido glicônico podem ser formados, em altos rendimentos, por processo biotecnológico catalisado pelas enzimas glicose-frutose oxidorreductase (GFOR) e glicono- δ -lactonase (GL) presentes no periplasma de células previamente cultivadas da bactéria anaeróbia *Zymomonas mobilis*. Nesse processo são geradas quantidades equimolares dos produtos, tornando-se um aspecto inconveniente para aplicação industrial desse sistema enzimático em virtude do mercado para o sorbitol ser muito maior que o do ácido glicônico e de seus sais.

Estudos mais recentes mostraram que o complexo GFOR/GL tem a capacidade de catalisar a formação de outros ácidos e sais orgânicos, alternativos ao ácido glicônico e gliconatos, que poderiam compor um conjunto de produtos que proporcionariam um balanço de produção compatível com a demanda comercial do sorbitol. Entre os novos produtos obtidos destacam-se o ácido lactobiônico (AL) e seus sais, que têm importantes aplicações na área médica e na indústria de cosméticos. Considerando essa abordagem, a pesquisa realizada no Instituto de Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul demonstrou a viabilidade técnica da utilização de células permeabilizadas de *Z. mobilis* como agentes de bioconversão de misturas de frutose e lactose em sorbitol e ácido lactobiônico, respectivamente.

Um aspecto importante do processo biotecnológico é a etapa de separação, que na maioria das vezes torna-se mais dispendiosa do que as etapas envolvidas na produção dos bioprodutos, tornando o processo inviável. A técnica de eletrodialise (ED) tem sido utilizada na separação de diferentes produtos formados em processos biotecnológicos por possibilitar que purificação e concentração dos produtos sejam realizadas em uma única etapa.

Na literatura, encontram-se diversos estudos onde a ED é utilizada para separar ácidos orgânicos resultantes de processos biotecnológicos, dentre eles, o ácido glicônico produzido por *Z. mobilis*. Neste processo o ácido glicônico é removido continuamente do meio reacional por

ED, facilitando controle do pH do processo e observando-se uma melhor estabilidade da enzima (GFOR/GL). Com relação ao ácido lactobiônico, não são descritos na literatura trabalhos que relatem a utilização desta técnica para a sua separação.

Face às características da reação que envolve o uso de dois substratos, a lactose e a frutose, e a formação de dois produtos, o sorbitol e o ácido lactobiônico, sendo esse último a única espécie iônica presente, a ED apresentou-se como uma técnica de separação adequada. Considerando-se ainda o alto valor comercial do ácido lactobiônico, que permite a inclusão de técnicas mais sofisticadas em seu processo de produção.

Este trabalho tem como objetivo geral avaliar a viabilidade da utilização da técnica de eletrodialise como alternativa para separação do ácido lactobiônico de soluções contendo lactose, frutose e sorbitol, provenientes de processos biotecnológicos catalisados por enzimas de *Z. mobilis*.

Os objetivos específicos foram os seguintes:

- estudar o sistema de eletrodialise com intensidade de corrente constante para a separação do ácido lactobiônico em solução padrão;
- avaliar a separação do ácido lactobiônico de solução padrão por eletrodialise conduzida com diferença de potencial constante;
- avaliar a separação de ácido lactobiônico presente em soluções padrão, contendo os substratos e produtos do processo biotecnológico de produção com a bactéria *Zymomonas mobilis*;
- separar o ácido lactobiônico do sorbitol e substratos (frutose/lactose) presentes no meio de bioconversão.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Neste capítulo, é apresentada uma revisão dos principais trabalhos encontrados na literatura envolvendo o uso do sistema enzimático glicose-frutose oxidorreductase (GFOR)/ glicono- δ -lactonase (GL) de *Z. mobilis* para a obtenção de bioprodutos e, ainda, generalidades sobre a técnica de eletrodialise, incluindo algumas de suas aplicações.

2.1. Produção biotecnológica de ácido lactobiônico e sorbitol

Na década de 80, no decorrer de estudos sobre a utilização de diferentes carboidratos por *Z. mobilis*, Viikari (1984) e Leigh *et al.* (1984) verificaram a capacidade dessa bactéria de produzir sorbitol e ácido glicônico, quando sacarose ou uma mistura de frutose e glicose eram utilizadas como substrato de fermentação. A elucidação do mecanismo bioquímico de produção de sorbitol e ácido glicônico por *Z. mobilis* deve-se a Zachariou & Scopes (1986), que identificaram as enzimas glicose-frutose oxidorreductase (GFOR) e glicono- δ -lactonase (GL).

A descoberta desse sistema enzimático resultou no desenvolvimento de novos processos tecnológicos de obtenção de sorbitol e ácido glicônico (Chun & Rogers, 1988; Rehr *et al.*, 1991; Silveira *et al.*, 1999). Esses processos, apesar de levarem a concentrações finais de sorbitol e ácido glicônico superiores a 300g.L⁻¹, com rendimentos próximos a 100%, têm como desvantagem o fato de os produtos serem formados em base equimolar, o que é inconveniente em virtude da demanda comercial de sorbitol ser muito maior que a do ácido glicônico e seus sais derivados.

Na **Figura 1** estão representados a via de Entner-Doudoroff e o mecanismo de formação do sorbitol, gliconato e etanol a partir de glicose e frutose como substratos pela bactéria *Z. mobilis*.

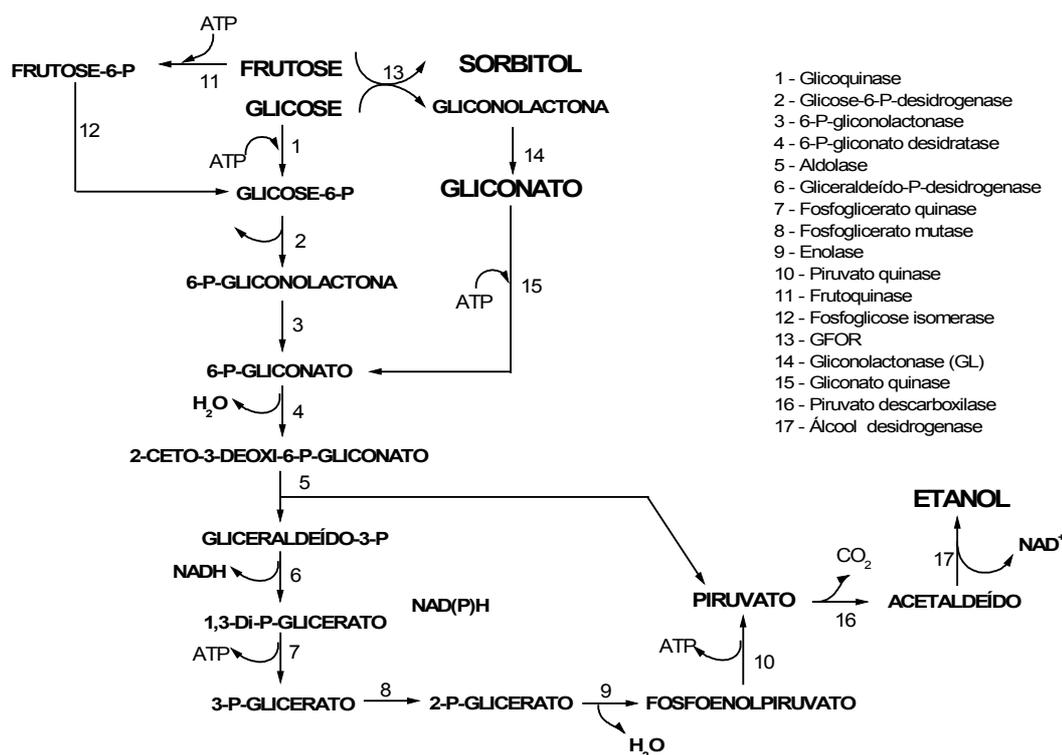


Figura 1: Mecanismo de formação do etanol, sorbitol e gliconato a partir de glicose e frutose pela bactéria *Z. mobilis* (Silveira & Jonas, 2002).

A bactéria *Z. mobilis* utiliza o caminho anaeróbico da via Entner-Doudoroff para degradar uma molécula de glicose em etanol e CO_2 . Quando altas concentrações de glicose e frutose são utilizadas como fonte de carbono, sorbitol, etanol e ácido glicônico são produzidos (Silveira & Jonas, 2002).

Hardman & Scopes (1988) demonstraram que o mecanismo de ação da GFOR é classificado como “ping-pong”, onde a GFOR é responsável pela redução de frutose a sorbitol concomitantemente com a oxidação de glicose a gliconolactona, utilizando NADP (nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato) como co-fator. Na seqüência, gliconolactona é convertida a ácido glicônico pela enzima glicono- δ -lactonase (GL). Em condições normais de metabolismo celular, o ácido glicônico retorna à via de Entner-Doudoroff para produção de etanol (Silveira & Jonas, 2002).

A equação clássica para a cinética “ping-pong” (Hardman & Scopes, 1988) é:

$$v = \frac{V}{\left(1 + \frac{k_f}{F} + \frac{k_g}{G}\right)}$$

onde:

- v = velocidade molar da reação ($\text{mol.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$)
- V = velocidade máxima da reação ($\text{mol.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$)
- k_f = parâmetro relativo à frutose (mol.L^{-1})
- k_g = parâmetro relativo à glicose (mol.L^{-1})
- F = concentração molar de frutose (mol.L^{-1})
- G = concentração molar de glicose (mol.L^{-1})

A produção de ácido glicônico e sorbitol pode ser obtida em altas concentrações e com baixa formação de etanol, utilizando-se células permeabilizadas de *Z. mobilis* na bioconversão de frutose e glicose nesses produtos. Em células permeabilizadas, o metabolismo normal da bactéria é inviabilizado (**Figura 2**) pela perda de metabólitos essenciais através dos poros formados, mas a atividade da GFOR/GL é mantida (Silveira & Jonas, 2002).

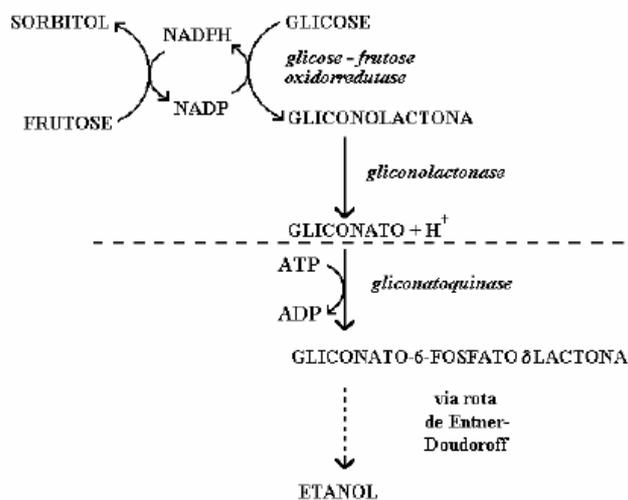


Figura 2: Esquema da rota empregada pela *Z. mobilis* na produção de sorbitol e ácido glicônico com células permeabilizadas (Ferraz, 1999).

Satory *et al.* (1997) mostraram que a enzima glicose-frutose oxidoreductase purificada tem a capacidade de oxidar, além da glicose, sete outras aldoses, levando à formação dos respectivos ácidos orgânicos, dentre eles o ácido lactobiônico, a partir da lactose. Esse trabalho abriu novas perspectivas para o processo de bioconversão catalisado por células contendo as enzimas GFOR e GL, como demonstra Malvessi *et al.* (2002). Através da identificação de substratos alternativos à glicose seria possível compor um conjunto de produtos (ácidos orgânicos e seus diferentes sais) que proporcionariam um balanço de produção compatível com a demanda comercial do sorbitol. Utilizando células de *Z. mobilis* em processo de bioconversão, Carra *et al.* (2003) obtiveram concentrações de ácido lactobiônico e sorbitol próximas a 200g.L⁻¹, com rendimentos acima de 85%, comprovando as conclusões de Satory *et al.* (1997) também em condições de bioconversão.

O ácido lactobiônico (**Figura 3**) e seu sal sódico (lactobionato de sódio) têm grande importância na área médica, já que, devido as suas propriedades quelantes, são utilizados na formulação de soluções de conservação de órgãos a serem transplantados, pois inibem a formação de radicais livres e mantêm o tecido vivo por até 48h (Sumimoto & Kamada, 1990).

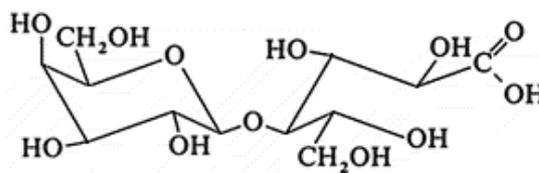


Figura 3: Estrutura química do ácido lactobiônico (Kansai Window, 2002).

O ácido lactobiônico é composto de uma molécula de galactose – açúcar quimicamente neutro utilizado na síntese de colágeno e na migração celular, com poder cicatrizante – e outra de ácido glicônico, encontrado naturalmente na pele e que apresenta grande capacidade de reter água. Assim, em razão de suas propriedades (hidratante, cicatrizante e anti-radicaís livres), o ácido lactobiônico e sua lactona passaram a ser utilizados em várias formulações de cosméticos

(Grimes *et al.* 2004). Adicionalmente, o ácido lactobiônico possui a vantagem de não ser fotossensível, podendo ser utilizado durante o verão, sob exposição da luz solar.

Ferraz *et al.* (2001) mostraram que o ácido glicônico, obtido por via biotecnológica com *Z. mobilis*, pode ser separado do sorbitol por eletrodialise (ED). O sistema de ED acoplado ao processo de bioconversão proporcionou uma maior estabilidade do complexo enzimático GFOR/GL, tornando desnecessária, ainda, a adição de base ao meio para o controle do pH. Tendo em vista o alto valor do ácido lactobiônico, a ED poderia ser empregada durante a sua produção.

A produção de sorbitol e ácido lactobiônico por GFOR/GL de *Z. mobilis*, assim como em qualquer reação enzimática, tem a velocidade de conversão de mistura de frutose e lactose significativamente reduzida quando concentrações muito baixas dos substratos encontram-se presentes no meio, conforme é ilustrado na **Figura 4** (Silveira, 2003).

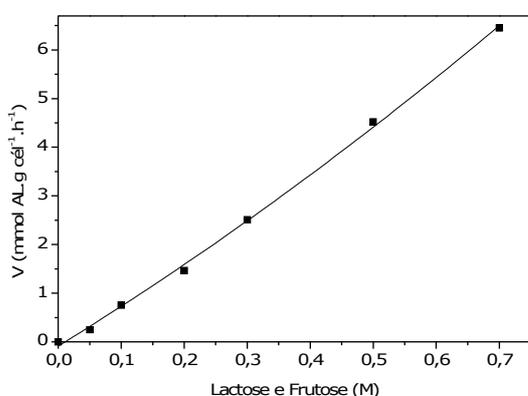


Figura 4: Velocidade específica de formação do ácido lactobiônico em relação à variação da concentração de frutose e lactose, com concentração celular de 4g.L^{-1} , temperatura de 39°C ; pH 6,4 e tempo de reação de 30min.

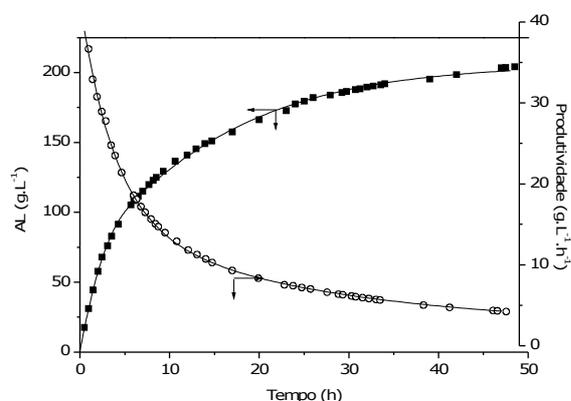


Figura 5: Variação da concentração de ácido lactobiônico e da produtividade em função do tempo para concentração inicial de lactose e frutose de $0,7\text{mol.L}^{-1}$; concentração celular de 25g.L^{-1} ; temperatura de 39°C e pH 6,4.

Com GFOR, em especial, em razão da baixa afinidade pelos substratos e do alto valor da constante de Michaelis-Menten (K_m), tem-se que as velocidades máximas práticas são atingidas com concentrações de frutose e lactose da ordem de $0,7\text{mol.L}^{-1}$ de cada açúcar.

Com isso, no decorrer do processo de produção, e à medida que as concentrações de substratos decrescem, a velocidade global e, em decorrência, a produtividade são fortemente afetadas (**Figura 5**). Portanto, para alcançar as máximas velocidades reacionais nesse sistema, é necessária a presença de concentrações elevadas de substratos (Silveira, 2003).

No entanto, para obtenção de uma boa produtividade, é preciso que o processo seja interrompido nas suas primeiras horas, tornando-o inviável, técnica ou economicamente, a menos que os substratos remanescentes possam ser reintroduzidos no sistema após a remoção dos produtos (Silveira, 2003).

Uma alternativa tecnicamente viável para separação dos produtos é a utilização da eletrodialise em conjunto à cromatografia líquida. O ácido lactobiônico, único componente iônico presente no sistema, seria removido por eletrodialise em um sistema *on-line* ao processo de bioconversão. Sorbitol seria separado por cromatografia líquida, com o reciclo dos substratos, lactose e frutose, para o biorreator (Pedruzzi & Rodrigues, 2006).

2.2. Eletrodialise (ED)

A técnica de ED foi desenvolvida, inicialmente, para dessalinização de águas na Europa e Estados Unidos e para extração de sal da água do mar no Japão. Com o crescente desenvolvimento de novos materiais e da técnica, a ED tem sido aplicada na remoção de espécies iônicas de soluções aquosas em situações como dessalinização de água salobra, concentração e dessalinização da água do mar e dessalinização de águas de torres de resfriamento (Scott, 1995; Strathmann, 2001).

Na indústria de alimentos, a ED é largamente empregada por possibilitar a separação de eletrólitos e não eletrólitos em processos como a desmineralização de vinhos (Heimoff, 1996), a neutralização ácida de sucos de frutas (Calle *et al.*, 2002) e a desmineralização do soro do leite (Porter, 1990). Modificada, a ED também é utilizada para separar misturas de aminoácidos e proteínas (Bobreshova *et al.*, 2002; Elisseeva *et al.*, 2002) e na produção de ácidos e bases, a partir de seus sais correspondentes dissociados em água, quando associada à corrente elétrica com membranas bipolares (Novalic *et al.*, 1997).

A tecnologia de membranas tem-se mostrado como uma excelente alternativa aos processos convencionais de separação, especialmente no caso de produtos com elevado valor de mercado. Os principais processos de separação que utilizam membranas estão caracterizados no **Quadro 1**, em função da força motriz da separação e da natureza do material retido e do material permeado.

Quadro 1: Caracterização dos processos de separação por membranas (Maldonado, 1991).

Processo	Força Motriz	Material Retido	Material Permeado
Osmose inversa	Diferença de pressão	todo material solúvel ou suspenso PM50	água (solvente)
Ultrafiltração	Diferença de pressão	colóides macromoleculares PM 5000	água (solvente) e sais
Microfiltração	Diferença de pressão	sílica em suspensão bactérias PM>500000	água e sólidos dissolvidos
Diálise	Diferença de concentração	moléculas de alto PM em suspensão PM >1000	íons e orgânicos de baixo PM
Eletrodiálise	Diferença de potencial elétrico	não iônicos e macromoléculas	íons
Permeação de gases	Diferença de concentração	gás menos permeável	gás mais permeável
Pervaporação	Diferença de concentração	líquido menos permeável	líquido mais permeável

A ED é um processo de separação por membranas no qual íons são transportados através de membranas íon-seletivas por influência de um campo elétrico. Os íons migram em direção aos eletrodos quando o campo elétrico é aplicado por meio de uma corrente contínua. Os ânions migram pela membrana aniônica em direção ao ânodo e os cátions migram para o cátodo pelas membranas catiônicas. Durante o processo de migração, os ânions são barrados pelas membranas catiônicas e os cátions pelas membranas aniônicas, formando-se duas soluções, uma concentrada e outra diluída (Rautenbach *et al.*, 1989). O esquema da passagem dos íons pelas membranas e a formação das soluções concentrada e diluída é representado na **Figura 6**.

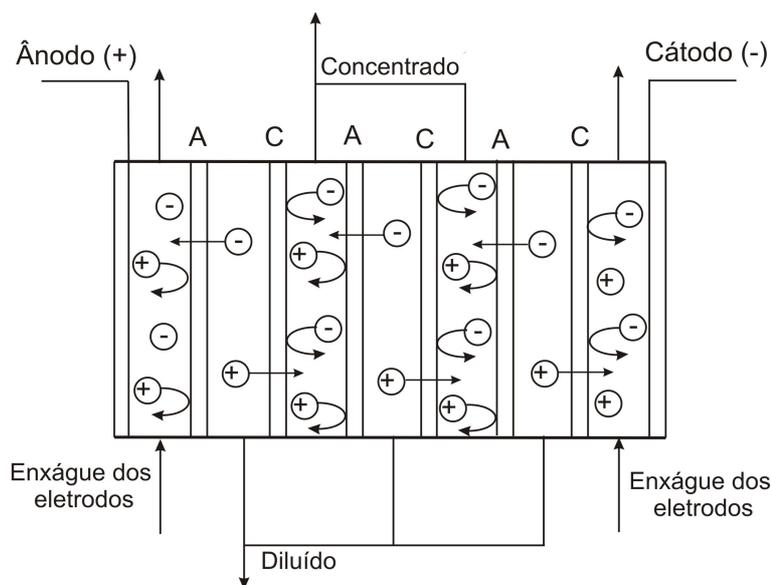


Figura 6: Princípio da transferência dos íons no processo de eletrodialise (Rautenbach *et al.*, 1989).

No processo de ED, apenas sólidos iônicos dissolvidos passam através da membrana, o solvente fica retido, facilitando os processos de separação e concentração de eletrólitos. A direção e a taxa de transporte de cada íon dependem da sua carga e mobilidade, da concentração e condutividade elétrica da solução, da voltagem aplicada, etc., e a separação esta intimamente relacionada às características das membranas de troca iônica (Strathmann, 2001, Pérez *et al.*, 2001).

A ED se diferencia dos outros processos de separação por membranas por utilizar membranas carregadas ionicamente, possuindo a propriedade de serem seletivas, permitindo, dessa forma, a passagem de cátions ou ânions (Rautenbach *et al.*, 1989). Outra diferença é que a força motriz na ED é a diferença de potencial aplicada por um campo elétrico, perpendicularmente à superfície das membranas (Arsand, 2001).

Na ED tem-se a vantagem de que o consumo de energia no processo é proporcional à quantidade de eletrólito a ser removido e não ao volume de solução a ser tratado. Além disso, a técnica pode operar em processo contínuo, não necessitando de etapas de regeneração como no caso da troca iônica, por exemplo (Strathmann, 2001).

Existem algumas limitações quanto à utilização da técnica de ED, tais como: separação de eletrólitos de alta massa molar, como abrillantadores e detergentes; uso de temperaturas superiores a 60°C; presença de solventes orgânicos na solução a ser tratada; precipitação de sais e hidróxidos insolúveis na superfície da membrana; presença de oxidantes fortes, que devem ser eliminados antes do processo; presença de sólidos suspensos (Porter, 1990).

2.2.1. Membranas íon-seletivas

As membranas íon-seletivas utilizadas em ED devem, essencialmente, ser permeáveis a cátions e/ou a ânions, possuir alta seletividade, possuir baixa resistência elétrica e possuir excelentes propriedades químicas e mecânicas (Rautenbach *et al.*, 1989). No **Quadro 2** são apresentadas algumas características de membranas comerciais utilizadas em processos de ED.

Quadro 2: Características das membranas comerciais íon-seletivas (Scott, 1995).

Membranas	Tipo	Estrutura/ Propriedade	Espessura (mm)	Resistência Elétrica ($\Omega \cdot \text{cm}^2$) 0,5M NaCl	Permeoseletividade (%) 1,0/0,5M KCl
Asahi Chemical Industry Company Ltd., Japan					
K 101	Catiônica	Estireno/DVB	0,24	2,1	91
A 111	Aniônica	Estireno/DVB	0,21	2-3	45
Asahi Glass Company Ltd., Japan					
AMP	Aniônica	Homogênea	0,27	3,5 – 5,5	-
AMT	Aniônica	Homogênea	0,15	2 – 3,5	-
CMV	Catiônica	Estireno	0,15	2,9	95
AMV	Aniônica	Butadieno	0,14	2 – 4,5	92
ASV	Aniônica	Monovalente	0,15	2,1	91
DMV	Catiônica	Díalise	0,15	-	-
Flemion®	Catiônica	Perfluorada			
Ionac Chemical Company, Syborn Corporation, Birmingham, NJ 08011					
MC 3470	Catiônica		0,6	6 – 10	68
MA 3475	Aniônica		0,6	5 – 13	70
MC 3D142	Catiônica		0,8	5 – 10	-
MA 3148	Aniônica		0,8	12 – 70	85
Du Pont Company, Wilmington, DE 19898					
N 450	Catiônica	Perfluorada	0,43	3	-
N 117	Catiônica	Perfluorada	0,2	1,5	-
N 901	Catiônica	Perfluorada	0,4	3,8	96

O tipo e a concentração da carga iônica fixada na matriz polimérica determinam a permeoseletividade e a resistência elétrica das membranas.

A íon-seletividade das membranas está baseada no princípio da ação/repulsão eletrostática. As membranas catiônicas são carregadas negativamente, mais comumente por grupos $-\text{SO}_3^-$, $-\text{COO}^-$, $-\text{HPO}_3^{2-}$, $-\text{PO}_3^{2-}$, $-\text{SeO}_3^-$ ou $-\text{AsO}_3^{2-}$. Já as membranas aniônicas diferem das catiônicas por serem carregadas positivamente por grupos quaternário de amônio, mono, di ou tri substituídos, ligados à matriz polimérica: $-\text{NH}_3^+$, $-\text{RNH}_2^+$, $-\text{R}_3\text{N}^+$, $=\text{R}_2\text{N}^+$ e grupos $-\text{R}_3\text{P}^+$ ou $-\text{R}_2\text{S}^+$. Assim, as cargas negativas permitem a permeação de cargas positivas e repelem as negativas (Strathmann, 2001).

Nas membranas seletivas a cátions, os ânions são fixados na matriz polimérica e a eletroneutralidade é obtida com cátions móveis no interstício do polímero, sendo que os cátions carregam toda a corrente elétrica. Nas membranas seletivas aniônicas são fixadas

cargas positivas sobre a matriz polimérica, assim a corrente é principalmente carregada por ânions (Rautenbach *et al.*, 1989). O esquema da matriz do polímero, com os ânions fixados e os cátions móveis, está representado na **Figura 7**.

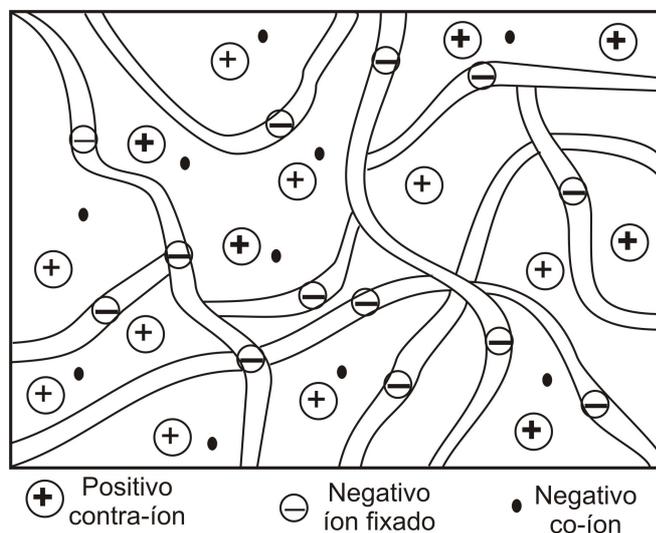


Figura 7: Arranjo iônico na matriz polimérica de uma membrana de troca iônica catiônica (Strathmann, 2001).

Os cátions móveis são denominados contra-íons. Ao contrário, os ânions móveis, denominados co-íons, são excluídos da matriz polimérica porque a sua carga elétrica é idêntica a dos íons fixados. Esse tipo de exclusão é conhecida como “exclusão de Donnan” (Strathmann, 2001).

As membranas de ED bipolares podem ser preparadas por laminação simultânea de membranas de troca iônica, sobrepondo uma membrana catiônica à outra aniônica.

De acordo com Madzingaidzo *et al.* (2002), na ED com membrana bipolar (EDB) soluções salinas aquosas podem ser convertidas em ácidos e bases correspondentes. O *stack* na EDB é similar a ED convencional, com membrana monopolar, com a inserção de um terceiro tipo de membrana, a membrana bipolar, que é composta pela laminação de uma membrana catiônica e uma membrana aniônica. Essa combinação entre a membrana bipolar

com as membranas monopolar catiônica e aniônica em um *stack* forma três correntes de separação, denominadas: ácida, básica e salina.

Um exemplo do sistema com membranas bipolares é apresentado na **Figura 8**. Reimann (2005) representa um arranjo com membranas bipolares e membranas catiônicas e aniônicas, formando três correntes: salina, ácida e básica. Durante a operação, íons de lactato e íons de sódio são removidos simultaneamente para o compartimento básico e ácido através das membranas aniônicas e catiônicas respectivamente. Ácido láctico livre é formado pela combinação de íons lactato e íons hidrogênio na camada de troca catiônica da membrana bipolar, enquanto hidróxido de sódio é gerado simultaneamente pela combinação de íons hidroxila e íons de sódio na camada de troca aniônica da membrana bipolar.

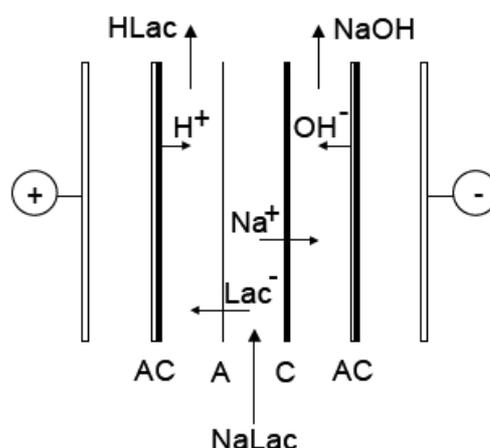


Figura 8: Esquema do processo de eletrodialise com membranas bipolares. AC (membrana bipolar), A (membrana aniônica) e C (membrana catiônica) para formação de ácido láctico e NaOH (Reimann, 2005).

Ácidos orgânicos produzidos em processos fermentativos são normalmente isolados como sais e posteriormente transferidos a ácidos por adição de ácido sulfúrico ou por um processo de separação eletrolítico (Altmeier *et al.*, 1997). Esse processo requer a utilização de uma membrana específica de troca iônica que permita a permeação do ânion do ácido orgânico requerido. O processo de separação é limitado pelo tipo da membrana aniônica, já

que no processo eletrolítico ocorre a dissociação da molécula. O próton que passa através da membrana catiônica (H^+) não oferece resistência, já o ânion que migra através da membrana aniônica possui um tamanho significativamente grande, e por esta razão representa um fator limitante na separação. Membranas convencionais de troca aniônica exibem condutividades elétricas muito baixas para ânions orgânicos, porque os canais da matriz reticulada do trocador iônico são muito estreitos para sua passagem. Com base nestas afirmações, Altmeier *et al.* (1997) desenvolveram uma membrana aniônica reduzindo o grau de reticulação ou alongando as unidades reticuladas. O resultado foi uma membrana com a matriz com uma estrutura aberta permeável a ânions grandes e com satisfatória dilatação e força mecânica.

2.2.2. Polarização por concentração

Um importante parâmetro a ser controlado na técnica de ED é a densidade de corrente-limite, que influencia diretamente na extração percentual de alguns íons. No processo de ED, a variação de concentração nas proximidades (interface) das membranas é que determina um maior desempenho do processo (Calle *et al.*, 2002).

Se a corrente aplicada no sistema for maior que a corrente-limite determinada, a concentração de íons próxima à superfície da membrana tenderá a zero, favorecendo a ocorrência de polarização por concentração. Portanto, a polarização por concentração é decorrente da aplicação de uma densidade de corrente superior à corrente que o sistema pode transportar (Arsand, 2001).

Segundo Ferraz (1999), a polarização por concentração é desprezível a baixas voltagens. Aumentos de voltagem levam a um drástico aumento da resistência elétrica e a uma diminuição da eficiência de utilização da corrente, provocando a decomposição da água.

Um indício da ocorrência de polarização por concentração é a variação no pH da solução que está sendo diluída. Outro indício é dado por uma queda na eficiência de corrente e um aumento na resistividade da solução (Rautenbach *et al.*, 1989).

O tipo de escoamento também é determinante para a ocorrência ou não de polarização por concentração. O escoamento laminar da solução a ser tratada pode ocasionar polarização devido à baixa renovação de solução próxima à superfície da membrana, o que resulta em uma diminuição rápida dos íons. Para minimizar o efeito procura-se utilizar um escoamento turbulento na solução a ser tratada (Porter, 1990).

Além de afetar a eficiência do processo de ED, a ocorrência de polarização por concentração pode ocasionar outro fenômeno, devido a mudanças no pH das soluções, chamado *fouling* (Scott, 1995; Porter, 1990).

Segundo Scott (1995), o *fouling* pode ser causado por qualquer material que se deposite na superfície das membranas, diminuindo ou impedindo o fluxo pela obstrução dos poros, afetando a eficiência do processo.

Alguns procedimentos podem ser adotados para evitar ou minimizar os efeitos de *fouling*: pré-tratamento da solução para remoção de matéria, como colóides; evitar a concentração de sais perto do nível de saturação da solução para evitar a cristalização; acidificação do concentrado para prevenir a precipitação de carbonato, por exemplo, e aplicação de eletrodialise reversa (EDR) (Strathmann, 2001; Scott, 1995).

Hayes (2004) cita que o processo de EDR foi introduzido no setor comercial em 1970. Segundo esse autor, nesse modo de operação, a polaridade dos eletrodos é revertida diversas vezes por hora, dependendo do processo, e os fluxos são simultaneamente trocados, de forma que o canal de água salobra se torne o canal do produto e vice-versa.

Analogamente, Pérez *et al.* (2001) definem que na EDR a eficiência do sistema pode ser melhorada invertendo periodicamente a polaridade dos eletrodos, revertendo, assim, a

direção do movimento dos íons. A solução que estava sendo concentrada vai sendo diluída e vice-versa, ressolubilizando os sais precipitados na superfície da membrana. A reversa é útil para desfazer filmes e outros depósitos, antes que possam causar *fouling* nas membranas.

As unidades de ED mais modernas operam com EDR, prevenindo os efeitos de polarização por concentração. É importante tanto como um pré-tratamento para a ED, quanto para aumentar a vida útil das membranas e reduzir o custo com produtos químicos, sendo, em muitos casos, utilizada em combinação com a osmose inversa (OI) e/ou com a ultrafiltração (UF) (Strathmann, 2001).

Strathmann (2001) relatam a existência de instalações de EDR na Rússia e na China, com capacidade para produção de 1.000.000m³/dia de água com um sistema de ED com 2.000 plantas em série. Em instalações desse porte, é necessária uma área de membrana de aproximadamente 1,5 milhões de m².

2.2.3. Aplicações do processo de eletrodialise

A ED tem sido usada nos Estados Unidos por décadas, mas se tornou comercialmente disponível nos anos 1960, aproximadamente 10 anos após a introdução da OI (Hayes, 2004).

Muitas são as aplicações do processo de ED na indústria. Algumas dessas aplicações estão apresentadas no **Quadro 3**.

Quadro 3: Aplicações industriais do processo de eletrodialise (Strathmann, 2001).

Aplicação	Design do stack e membranas	Classificação	Problemas-chave
Dessalinização de água salobra	membrana catiônica e aniônica/escoamento turbulento e laminar	Comercial	
Água de alimentação para caldeiras, água aquecida para processos industriais	membrana catiônica e aniônica, escoamento turbulento e laminar	Comercial	Custos/ escalonamento
Produção de sal	membrana catiônica e aniônica, escoamento laminar	Comercial	Custo
Efluente industrial	membrana catiônica e aniônica, escoamento turbulento e laminar	Comercial	Custo
Tratamentos atóxicos	escoamento turbulento e laminar	-	Remoção
Indústria de alimentos e farmacêutica	membrana catiônica e aniônica, escoamento turbulento e laminar	Comercial	<i>Fouling</i> das membranas/perda de produto
Dialisador de difusão para ácidos	membrana catiônica, escoamento laminar	Comercial	Custo
Água de alta pureza (indústria de condutores)	stack com membranas tubulares	Comercial	Confiabilidade do processo
Dissociação de água	membrana bipolar, célula de três compartimentos	Comercial	Desempenho das membranas

De acordo com Strathmann (2001), em termos de números de instalações, a mais importante aplicação do processo de ED é a produção de água potável a partir de água salobra. Nesse processo a ED compete diretamente com a OI. Para produção de água com baixa concentração de sal (menor que 5.000ppm), a ED é geralmente o processo mais econômico, obtendo altas concentrações do sal, entre 18 e 20% em massa, sem afetar economicamente o processo. A ED, quando utilizada no tratamento de efluentes, possui a vantagem de utilizar membranas térmica e quimicamente estáveis, o que possibilita o funcionamento com temperaturas mais altas e variações de pH.

Hayes (2004) menciona outras vantagens do processo de ED, em relação à OI, no tratamento de águas de processo, como a habilidade de separar um largo espectro de constituintes iônicos, não apenas íons de sódio e cloreto, mas também bário, cátions de metais

pesados e ácidos voláteis, que compõem a maioria dos produtos orgânicos das águas de processo. Além disso, a ED possui a capacidade de reduzir o volume de água salobra por um fator 10:1, em comparação a 3:1 para OI.

Na produção de sal a partir de água do mar – uma técnica largamente utilizada no Japão – usa-se a ED para concentrações de cloreto de sódio acima de 200g.L^{-1} antes da evaporação. São produzidas mais de 350.000 t por ano de sal com a utilização dessa técnica. Uma instalação dessa magnitude requer uma área de membranas de troca iônica da ordem de 500.000 m^2 (Strathmann, 2001).

Em processos onde se necessita a utilização de água ultrapura, como na indústria de eletrônicos, farmacêutica, hospitais e laboratórios, uma melhoria no processo de ED foi realizada. Foram introduzidas no compartimento de alimentação resinas de troca iônica e o processo passa a ser conhecido comercialmente como eletrodesionização (EDI). A maior vantagem desse processo é que, além de remover os sais residuais, espécies como dióxido de carbono, sílica, amônia e boro também são removidos (Hayes, 2004).

Estudos referentes à técnica de ED na indústria química e alimentícia têm sido desenvolvidos nos últimos anos. Uma das aplicações da técnica é na desmineralização do soro do leite. Normalmente, o soro do leite contém entre 5,5 e 6,5% de sólidos dissolvidos. O soro fornece uma excelente fonte de proteínas, lactose, vitaminas e minerais, mas na sua forma normal não é considerado apropriado para alimentação, devido à grande quantidade de sal que contém. Com a remoção substancial dos sais ionizados, o soro aproxima-se da composição do leite humano e provê uma excelente fonte para produção de alimentos para bebês. Por exemplo, em uma instalação com capacidade de 35.000m^2 de área de membranas para produção de mais de 150.000 t por ano de lactose dessalinizada, é uma das aplicações mais econômicas e talvez a mais importante aplicação de ED na indústria alimentícia (Strathmann, 2001).

Outra aplicação de ED na indústria alimentícia é na remoção do ácido tartárico do vinho (Heimoff, 1996). A concentração de sais de tartarato pode ser reduzida a valores que não excedam o limite de solubilidade.

Os aminoácidos são amplamente utilizados na indústria de alimentos e farmacêutica pela sua bioatividade e por isso é importante produzi-los com alto grau de pureza. São obtidos geralmente por meio de hidrólise protéica e síntese microbiológica e química, onde são contaminados por componentes minerais. O processo usualmente utilizado na separação desses aminoácidos é a troca iônica multiestágio, porém esse requer o uso de reagentes caros. Como uma alternativa ecológica de desmineralização e fracionamento de aminoácidos o processo de ED com membranas de troca iônica pode ser utilizado (Bobreshova *et al.*, 2002). Elisseeva *et al.* (2002) utilizaram a ED para separar aminoácidos produzidos por processo biotecnológico de sais minerais e açúcar.

Na indústria farmacêutica, a ED tem sido estudada em escala de laboratório. Muitos desses estudos estão relacionados com a dessalinização de soluções contendo agentes ativos que têm que ser separados, purificados ou isolados de certos substratos (Strathmann, 2001). Um exemplo é o das misturas racêmicas. Muitos fármacos contêm um ou mais átomos de carbono assimétrico, resultando em no mínimo dois estereoisômeros. Frequentemente, um dos estereoisômeros é mais ativo para uma dada função (eutômero), enquanto o outro (distômero) é inativo, ou ainda causa efeitos colaterais severos. Uma enantioseparação pode ser alcançada por ED em multiestágios, como sugerem Van der Ent *et al.* (2002).

Novalic *et al.* (2000) utilizaram a ED com membranas bipolares em um sistema combinado com a ED convencional, com membranas íon-seletivas, para separar ácidos orgânicos como: ácido láctico, ácido propiônico e ácido acético, bem como o ácido glucônico e seu sal gliconato de sódio. Nesse sistema, os agentes neutralizantes como NaOH ou NH₄OH

podem ser reciclados e conseqüentemente o impacto ambiental reduzido. Outra vantagem é que o produto final é purificado e concentrado simultaneamente.

Reimann (2006) cita um processo resultante de sucessivos passos para obtenção do ácido láctico purificado após um processo fermentativo. Foram utilizados no estudo os processos de: ultrafiltração, eluição em resina de troca iônica, eletrodialise com membrana monopolar e com membrana bipolar e evaporação. Segundo o autor, o número de passos influencia fortemente na qualidade e no custo do produto. Os custos totais são determinados pelos pré e pós-tratamentos e não pelo processo fermentativo, portanto investimentos em tratamentos não agressivos e em tecnologias atrativas em termos de energia, engenharia ambiental e de segurança são necessários.

Chukwu & Cheryan (1999) descreveram um processo contínuo integrado em que um biorreator foi diretamente ligado a um sistema de ED com membranas monopolares, onde o ácido acético produzido foi recuperado, concentrado (a 134g.L^{-1}) e purificado simultaneamente. O açúcar residual e os nutrientes retidos na corrente diluída foram recirculados no biorreator para facilitar a otimização desse material, com concomitante redução na geração de resíduos.

De outro modo, Pinacci & Radaelli (2002) utilizaram configurações alternativas de ED convencional e ED com membranas bipolares para separar o ácido cítrico proveniente de processo fermentativo. A solução de citrato de sódio proveniente da fermentação é primeiramente clarificada por microfiltração e posteriormente concentrada e purificada por ED e EDB, levando à produção de ácido cítrico e soda cáustica que pode ser reciclada na fermentação.

Hongo *et al.* (1986) observaram que no processo fermentativo de produção de ácido láctico por *Lactobacillus delbrueckii* ocorria inibição pelo produto. Com o objetivo de minimizar esse efeito inibitório, utilizaram um método de fermentação com eletrodialise

(ED-F) que removía continuamente o ácido láctico produzido. O resultado dos ensaios apresentaram uma produtividade 3 vezes maior e um montante total de 5,5 vezes maior em relação à fermentação sem controle de pH.

Em um outro estudo, ácido glucônico produzido por *Z. mobilis* é removido continuamente do meio reacional por um sistema de três compartimentos ED com membranas de troca iônica (catiônica e aniônica), observando-se uma melhor estabilidade da enzima e um controle do pH do processo. Nesse trabalho também foi demonstrada a recuperação de ácido glucônico produzido por *Z. mobilis* em um biorreator de ED com um sistema de membranas de fibra oca, onde a suspensão de células permeabilizadas era confinada no interior das fibras ou no espaço externo às mesmas, ressaltando o bom desempenho do sistema sobre o efeito do pH local na taxa de reação (Ferraz *et al.*, 2001).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Produção do ácido lactobiônico

A produção do ácido lactobiônico envolve quatro etapas distintas: produção de células de *Zymomonas mobilis* com alta atividade enzimática (GFOR/GL), concentração das células contendo as enzimas, permeabilização e imobilização e biotransformação de lactose e frutose em ácido lactobiônico e sorbitol, respectivamente. Estas etapas serão discutidas a seguir.

3.1.1. Microrganismo

O microrganismo utilizado foi a bactéria *Zymomonas mobilis* ATCC 29191. A manutenção dessa cepa foi feita a 4°C em meio semi-sintético (Erzinger *et al.*, 2003).

3.1.2. Meio de cultura básico

O meio semi-sintético modificado (SSM) utilizado na conservação das culturas e na produção de biomassa e enzimas tem a seguinte composição (em g.L⁻¹): glicose, 20 (conservação), 100 (preparo do inóculo), 150 (produção de biomassa/enzimas); (NH₄)₂SO₄, 2,0; MgSO₄.7H₂O, 1,0; KH₂PO₄, 3,5; extrato de levedura bruto Prodex (Prodesa), 7,5. Na preparação de inóculos, o pH do meio foi controlado com CaCO₃ (5g.L⁻¹) (Malvessi *et al.*, 2006).

3.1.3. Cultivos celulares para produção de enzimas

Os cultivos celulares foram realizados em regime descontínuo em biorreator Biostat B (B. Braun Biotech) (**Figura 9**) com 4,5L de volume útil, a 30°C e controle automático de pH em 5,5 com adição de NaOH 5mol.L⁻¹. Ao término do cultivo, o líquido fermentado foi recolhido e centrifugado a 8.000rpm, a 10°C, por 20min, em uma centrífuga Sigma 4K15. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em água a uma concentração entre 150 e 200g.L⁻¹.



Figura 9: Biorreator Biostat B – B. Braun Biotech utilizado para a produção de biomassa celular e enzimas.

3.1.4. Permeabilização e imobilização das células de *Zymomonas mobilis*

Para a permeabilização das células, foi utilizado o procedimento descrito por Rehr *et al.* (1991), adaptado por Erzinger (1996). A uma suspensão de células de concentração de aproximadamente 25g.L⁻¹, foi adicionado igual volume de solução de brometo de cetil-trimetil amônio (CTAB) 0,2 % (p/v). A mistura foi mantida a 4°C sob agitação magnética, por 10

min. Posteriormente, a suspensão foi centrifugada a 6000rpm em uma centrífuga Sigma 4K15, a 10°C, por 10min. O material centrifugado foi ressuspensão a 100mL com água destilada e utilizado nos ensaios de atividade enzimática e biotransformação.

A metodologia adotada para a imobilização em alginato de sódio, visando o encapsulamento de *Z. mobilis*, foi descrita por Erzinger (1999), com algumas modificações (Carra et al., 2005). Alginato de sódio Algogel 5540 (Degussa Flavors & Fruit Systems do Brasil Ltda), na concentração de 4% (p/v), foi dissolvido em água destilada, colocado para hidratar sob agitação magnética por 12h, à temperatura ambiente. Após esse período, à solução foi adicionado igual volume de suspensão celular de *Z. mobilis*, levando a concentração final da solução de alginato à metade. A mistura foi mantida sob agitação por cerca de 2h, para a perfeita homogeneização. Para a formação das esferas de alginato de cálcio e imobilização das células, todo o volume desta suspensão foi lentamente gotejado através de capilar de silicone, com a extremidade afunilada (agulhas hipodérmicas) e com o auxílio de bomba peristáltica, em solução de CaCl_2 $0,3\text{mol.L}^{-1}$. Após a formação das esferas, estas foram reticuladas com glutaraldeído 0,5% (m/v) por 15min, sob agitação magnética, à temperatura ambiente.

3.1.5. Bioconversão de frutose e lactose em sorbitol e ácido lactobiônico

A produção de ácido lactobiônico foi realizada em biorreator com 300mL de volume sob agitação magnética. O processo foi conduzido a 39°C, com pH 6,4 controlado automaticamente através do controlador de pH (Consort R735), com NaOH (7mol.L^{-1}). Foram utilizados meios com concentração $0,7\text{mol.L}^{-1}$ de lactose/frutose e 25g.L^{-1} de células de *Z. mobilis* previamente permeabilizadas e imobilizadas em alginato de cálcio.

3.2. Separação do ácido lactobiônico por eletrodialise

3.2.1. Sistema de eletrodialise

Os ensaios de ED foram realizados em escala de bancada em um sistema de três compartimentos: anódico, catódico e um compartimento intermediário, que comporta a solução de alimentação (**Figura 10**). Cada compartimento, confeccionado em acrílico transparente, possui capacidade para 120mL de solução.

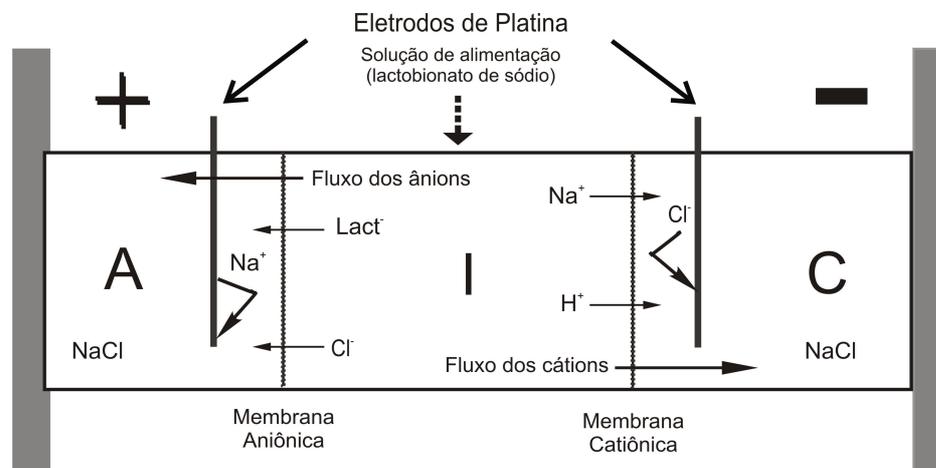


Figura 10: Esquema da dissociação dos íons em um sistema de eletrodialise de três compartimentos com solução de ácido lactobiônico na forma de seu sal sódico. (A) compartimento anódico, (C) compartimento catódico e (I) compartimento intermediário.

Os eletrodos de platina em forma de placa (35mm × 55mm) são ligados a uma fonte de força eletromotriz (fem) de corrente contínua Power Supply Minipa MPC – 3006D (Laboratory DC Power Supply). Para minimizar a polarização, que pode ser ocasionada pela baixa renovação de solução na superfície da membrana, como citado anteriormente, foi usada agitação magnética nos três compartimentos.

Os ensaios foram monitorados pelas medidas de condutividade elétrica no compartimento intermediário, com um condutímetro Digimed DM - 31; medidas de pH das soluções iniciais e finais e medidas de temperatura nos compartimentos anódico e catódico. O

pH inicial das soluções era de aproximadamente 5-6 em todos os compartimentos e a temperatura inicial variava com a temperatura ambiente, normalmente em torno de 15°C - 20°C com variação de ($\pm 5^\circ\text{C}$) no final do ensaio. O sistema completo está representado na

Figura 11.

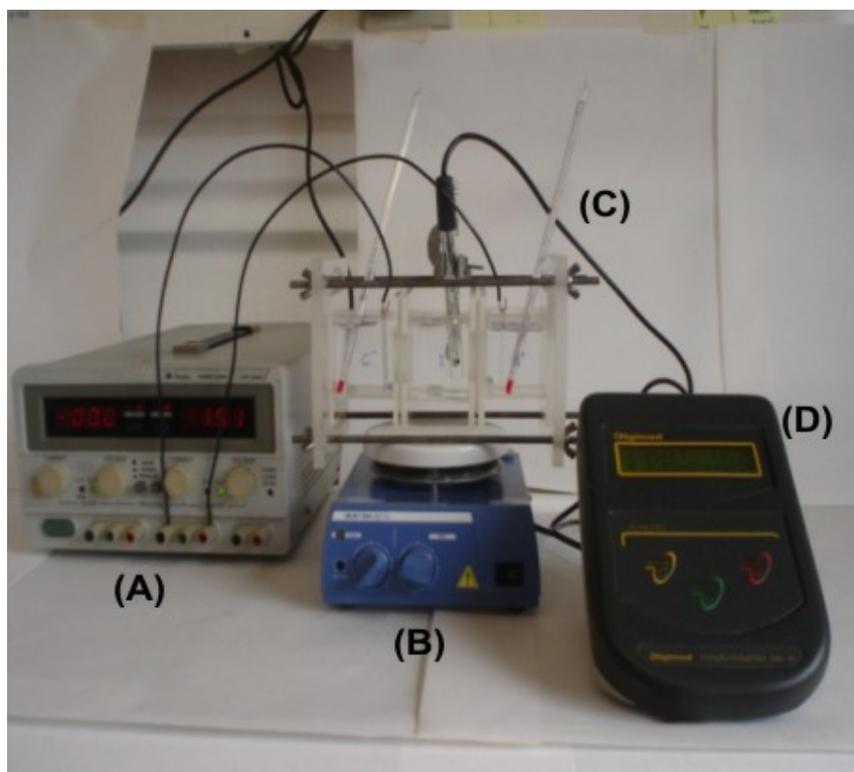


Figura 11: Sistema completo de eletrodialise utilizado na separação de ácido lactobiônico. (A) fonte de força eletromotriz (fem), (B) agitador magnético, (C) sistema de eletrodialise de três compartimentos e (D) condutivímetro.

Após cada ensaio foi realizada uma eletrodialise reversa (EDR) para remoção de qualquer substância que possa ter ficado aderida à superfície da membrana. Para tanto, NaCl 20g.L⁻¹ foi adicionado em todos os compartimentos e aplicou-se corrente elétrica no sentido inverso a ED convencional por até 2h. Após a EDR, as soluções dos três compartimentos foram analisadas em HPLC, para avaliar o sistema quanto à retenção de ácido lactobiônico, lactose, frutose e sorbitol na superfície da membrana.

3.2.2. Membranas utilizadas nos ensaios de eletrodialise

Testaram-se as membranas comerciais íon-seletivas da Ionics® de caráter catiônico e aniônico. A área das membranas exposta foi de aproximadamente 11cm². As características estão descritas no **Quadro 4**.

Quadro 4: Características das membranas comerciais Ionics®.

Nome	Tipo	Resistência Elétrica (ohms.cm ²)	Espessura (mm)	Aplicação
Ionics AR204-SZRA	Membrana íon-seletiva aniônica	7	0.51	Purificação de orgânicos e concentração de inorgânicos
Ionics CR67-HMP	Membrana íon-seletiva catiônica	10	0.56	Purificação de orgânicos e concentração de inorgânicos

3.2.3. Soluções

Os ensaios de ED foram realizados inicialmente com soluções de ácido lactobiônico na forma de seu sal sódico (MM = 358,3g.mol⁻¹), produzido por bioconversão no Laboratório de Processos Biotecnológicos 2 do IB/UCS e cristalizado com solvente orgânico (ALC), utilizado como padrão. A concentração da solução inicial de ALC, medida por cromatografia em fase líquida (HPLC), variava ligeiramente em torno de 20g.L⁻¹ devido aos diferentes lotes de produção de ALC.

O Sorbitol, produto equimolar da bioconversão (MM = 182,17 g.mol⁻¹) e os substratos lactose (MM = 342,30 g.mol⁻¹) e frutose (MM = 180,16 g.mol⁻¹) foram preparados com reagentes p.a. para determinação de parâmetros do sistema, tais como: densidade de corrente, tensão do sistema, velocidade máxima de remoção e fluxo através da membrana.

Após essa etapa foram utilizados nos ensaios de ED meios de bioconversão com aproximadamente 200g.L⁻¹.

O meio de bioconversão utilizado nos ensaios foi filtrado com sistema Millipore de microfiltração e membrana de acetato de celulose da marca Sartorius de 0,45µm de tamanho de poro.

Nos demais compartimentos do sistema de ED foi utilizada uma solução de NaCl 20g.L⁻¹, conforme descrito por Ferraz *et al.* (2001).

Comparativamente foram realizados ensaios com soluções de ácido lactobiônico comercial da Acros Organics com 97% de pureza e com gliconato de sódio p.a. Vetec.

3.2.4. Métodos analíticos

- Medida de concentração celular

As concentrações celulares foram determinadas pela medida da absorbância em 560nm de suspensões diluídas de células. Esses valores foram convertidos para concentração (massa de matéria seca por unidade de volume) mediante uma curva de calibração.

- Determinação de carboidratos e ácidos orgânicos

A determinação da concentração do ácido lactobiônico e gliconato de sódio, bem como de lactose, frutose e sorbitol, foram realizadas por cromatografia em fase líquida (HPLC) em aparelho Hewlett-Packard equipado com detector de índice de refração e coluna Aminex HPX 87H para ácidos orgânicos. A coluna da marca BIO-RAD possui as seguintes características: fase fixa de PE-DVB (polietileno divinilbenzeno), forma iônica H⁺, dimensões 300mm × 78mm, tamanho de poro de 9µm e fase móvel típica H₂SO₄ 5mmol.L⁻¹. A melhor

condição de análise foi para vazão de $0,6\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ de H_2SO_4 $0,5\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ e temperatura de 60°C . A descrição do desenvolvimento da metodologia está apresentada no **Anexo**.

- Determinação da atividade das enzimas glicose-frutose oxidoreductase (GFOR) e glicono- δ -lactonase (GL)

Para a determinação da atividade conjunta das enzimas GFOR e GL em células permeabilizadas de *Z. mobilis*, foi utilizada a técnica da titulação automática com NaOH $1\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ com a reação ocorrendo em solução $0,7\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ de lactose e frutose, sendo a atividade definida pela massa molar de ácido lactobiônico produzida a 39°C e pH 6,4. Uma unidade enzimática de GFOR/GL (U) é definida como mmol de ácido formado, correspondente ao substrato utilizado, por hora, sendo a atividade expressa em unidades por grama de células secas ($\text{U}\cdot\text{g}^{-1}$).

- Determinação do fluxo molar de ácido lactobiônico permeado através da membrana (N)

O fluxo molar dado em $\text{mmol}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{min}^{-1}$ foi calculado pela relação do coeficiente angular da reta de concentração de AL em função do tempo - v_{mr} ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$), a área de membrana utilizada (11cm^2) e o volume da solução (120mL).

- Determinação da velocidade máxima de redução da condutividade (v_{mc})

A v_{mc} foi calculada pelo coeficiente angular da reta de condutividade de AL em função do tempo ($\text{mS}\cdot\text{cm}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$).

- Determinação da resistência aparente do sistema (R_{ap})

A R_{ap} foi calculada pela medida entre potencial e corrente elétrica em cada instante pela relação ($R = V\cdot I^{-1}$).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados dos ensaios de eletrodialise são apresentados e discutidos, primeiramente, em termos de eficiência da membrana Ionics® na dessalinização e na separação do ácido lactobiônico cristalizado, comparativamente ao ácido lactobiônico comercial e ao gliconato de sódio. Posteriormente, foram avaliadas as melhores condições, entre os parâmetros de operação testados, na recuperação do ácido lactobiônico de soluções padrão. Adicionalmente, a separação de ácido lactobiônico dos demais produtos do processo biotecnológico de bioconversão com a bactéria *Zymomonas mobilis* foi avaliada.

4.1. Avaliação preliminar do sistema de eletrodialise para a separação de ácido lactobiônico

Primeiramente foi avaliada a eficiência do sistema de ED frente à dessalinização, utilizando-se as membranas Ionics®. O ensaio foi realizado alimentando-se uma solução contendo 36g.L⁻¹ de NaCl no compartimento intermediário e nos compartimentos laterais, uma solução de 20g.L⁻¹ do sal. A condutividade da solução de alimentação foi monitorada, bem como a concentração em um condutivímetro (**Figura 12**).

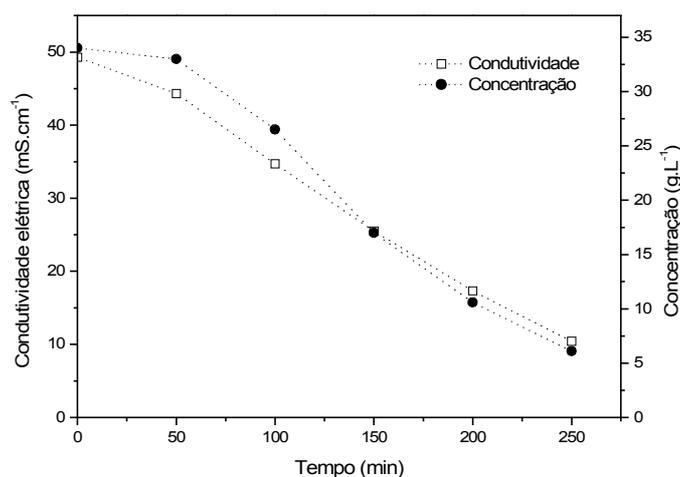


Figura 12: Condutividade elétrica e concentração de NaCl no compartimento de alimentação em função do tempo para um ensaio de eletrodialise com NaCl 36g.L⁻¹ no compartimento intermediário e NaCl 20g.L⁻¹ nos compartimentos anódico e catódico, para um potencial constante de 15V.

A condutividade elétrica e a concentração possuem um comportamento decrescente no compartimento intermediário, demonstrando que os íons estão sendo transferidos pela diferença de potencial elétrico aplicado (ddp). Como pode ser observado, o desempenho do sistema na remoção do sal foi proporcional com redução de 81,34% na concentração e 79% na condutividade elétrica. De fato, a produção de água potável a partir de água salobra é a mais importante aplicação da ED em termos de número de instalações (Strathmann, 2001).

No ensaio de dessalinização (**Figura 12**), a relação entre a condutividade elétrica e a concentração do sal na solução de alimentação foi proporcional. Com o objetivo de utilizar a medida da condutividade elétrica para obter a concentração de ALC recuperado, realizaram-se medidas da condutividade de soluções de ALC com concentrações entre 1 e 100g.L⁻¹ e o resultado está apresentado na **Figura 13**.

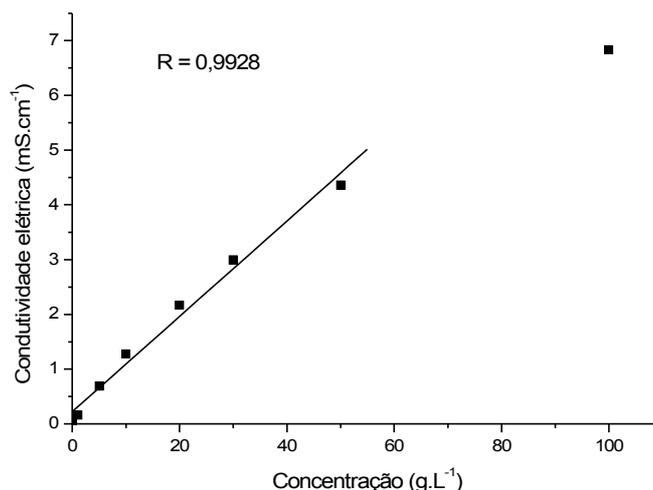


Figura 13: Condutividade elétrica em função da concentração de ácido lactobiônico cristalizado (1, 5, 10, 20, 30, 50 e 100g.L⁻¹).

O coeficiente de correlação ($r = 0,9928$), calculado segundo dados da **Figura 13**, para concentrações de ALC de até 50g.L⁻¹ demonstra que a medida da condutividade elétrica poderia ser utilizada como uma forma de estimar o valor da concentração de AL. A redução na condutividade no compartimento de alimentação também permite uma visualização instantânea da permeação dos íons pela membrana, bem como a velocidade máxima de redução da condutividade (v_{mc}). Novos ensaios foram realizados e o monitoramento da condutividade foi estudado como uma alternativa de controle e da eficiência do processo, não eliminando a necessidade de determinações de concentração por HPLC. Deve-se levar em consideração que, com a aplicação da ddp elétrica além do lactobionato de sódio, as demais espécies iônicas envolvidas que também sofrem eletrólise, como a água e o NaCl, poderiam influenciar na medida da condutividade elétrica. Além disso, para soluções contendo mais de uma espécie iônica, essa medida não poderia ser utilizada.

O uso do sistema de ED, com membrana Ionics[®], para separação de ácido glicônico e gliconato de sódio foi estudado anteriormente por Ferraz *et al.* (2001). Com o fim de avaliar a eficiência do sistema de ED disponível para realização do presente trabalho, foram realizados

ensaios preliminares de recuperação de ALC, AL comercial 97% e gliconato de sódio p.a., todos na concentração de 20g.L^{-1} . Na **Figura 14** foi analisada a variação da condutividade elétrica ao longo do tempo para os três componentes.

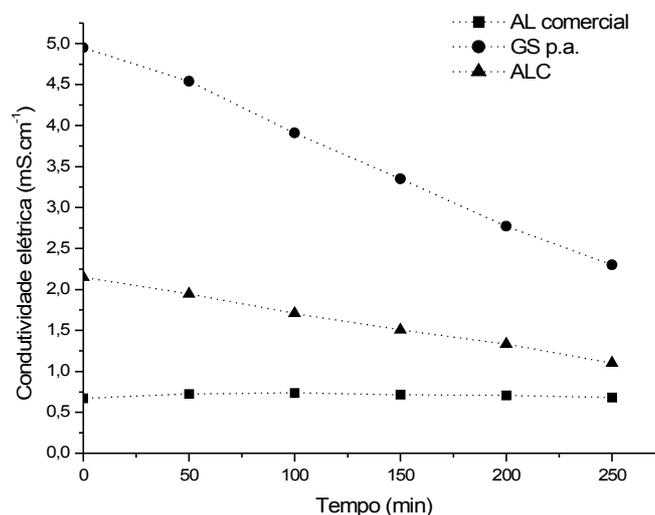


Figura 14: Condutividade elétrica em função do tempo para um ensaio de eletrodialise com uma solução de ácido lactobiónico cristalizado (20g.L^{-1}) em comparação ao ácido lactobiónico comercial (20g.L^{-1}) e gliconato de sódio p.a. (20g.L^{-1}), para um potencial constante de 15V .

A concentração das substâncias no compartimento anódico, após 250min de ensaio (**Tabela 1**), também foi avaliada.

Tabela 1: Concentração e recuperação no compartimento anódico em um ensaio de eletrodialise com uma solução de ácido lactobiónico cristalizado (ALC) em comparação ao ácido lactobiónico comercial (AL) e ao gliconato de sódio p.a. (GS), em concentrações de 20g.L^{-1} , para um potencial constante de 15V .

Soluções	Concentração no compartimento anódico (g.L^{-1})		Recuperação (%)
	100min	250min	250min
AL comercial	0,75	2,13	16,18
GS p.a.	4,61	9,10	43,56
ALC	2,73	6,53	38,73

A medida da condutividade elétrica representou o comportamento de recuperação no compartimento anódico. A recuperação é maior para a solução de gliconato de sódio (GS) com $43,56\%$ e velocidade máxima da redução da condutividade (v_{mc}), calculada pela derivada

da condutividade com o tempo, de $0,011\text{mS}\cdot\text{cm}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$, possivelmente por apresentar uma estrutura molecular menor, facilitando a mobilidade através da membrana. O AL comercial apresentou uma recuperação bem inferior em relação ao ALC, 16,18% e 38,73% respectivamente. A v_{mc} para o ALC foi de $0,0042\text{mS}\cdot\text{cm}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$, aproximadamente cem vezes maior que para o AL comercial. A baixa mobilidade do AL comercial poderia ser explicada pelo produto apresentar-se, em parte, na forma de lactona, como mostraram análises feitas em HPLC (vide **Anexo**). Já o ALC apresenta um grau de pureza superior como também foi constatado em análise cromatográfica.

Os resultados desses ensaios iniciais demonstram que o sistema de ED é viável para a separação de ácido lactobiônico, observando-se, ainda, que o ALC pode ser utilizado para a realização do trabalho.

4.2. Avaliação do sistema de eletrodialise com densidade de corrente constante

Após verificar as condições favoráveis para utilização da membrana íon-seletiva Ionics® em ED, realizou-se ensaios em sistemas de três compartimentos para avaliar a eficiência na recuperação do ácido lactobiônico (AL). Uma solução de $20\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de ácido lactobiônico cristalizado (ALC) foi alimentada no compartimento intermediário e solução de NaCl ($20\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) foi adicionada nos compartimentos laterais. Aplicou-se ao sistema uma corrente elétrica constante de 49mA que resultou em uma ddp elétrica variável. A condutividade elétrica da solução de alimentação foi monitorada e o ensaio foi realizado em 800min (**Figura 15**).

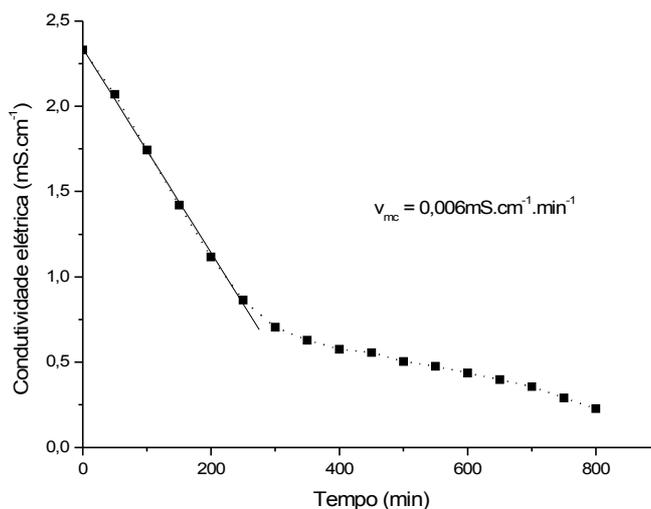


Figura 15: Condutividade elétrica em função do tempo para um ensaio de eletrodialise com solução de ácido lactobiônico cristalizado (20g.L^{-1}) e corrente constante de 49mA .

O transporte dos íons apresentou um comportamento decrescente ao longo do tempo no compartimento intermediário, com uma v_{mc} de $0,006\text{mS.cm}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$, tendendo a uma estabilização a partir de 250min .

A recuperação do ácido lactobiônico no compartimento anódico, para densidade de corrente elétrica aplicada de $4,5\text{mA.cm}^{-2}$, foi em torno de 60% em 800min .

A passagem da corrente elétrica pôde ser evidenciada pelo desprendimento de gás na superfície dos eletrodos. Outro fenômeno observado foi a alteração do pH nos compartimentos. Antes da aplicação da ddp elétrica o pH era de aproximadamente 6. No compartimento catódico a solução tornou-se fortemente alcalina com pH em torno de 12-13, e no compartimento anódico, ácida, com valor de pH de 2-3. Essas alterações no pH indicam que reações de dissociação, formação e oxi-redução ocorreram nos eletrodos, tais como: dissociação do NaCl, redução do Cl^- com liberação de Cl_2 , desprotonação do ácido lactobiônico, dissociação da água, dissociação do lactobionato de sódio, entre outras, também é ilustrado por Dalla Costa (1996) e Roux-de Balmann *et al.* (2002).

No ensaio seguinte, foi realizada uma avaliação cinética da recuperação do AL ao longo do tempo (400min), com corrente elétrica constante de 46mA (**Figuras 16 e 17**).

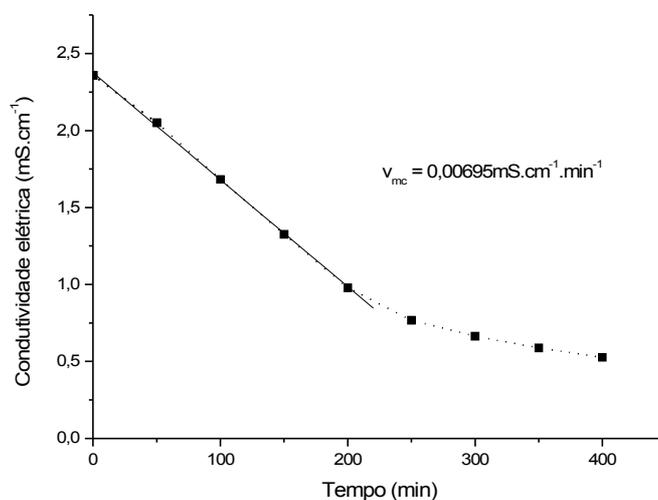


Figura 16: Condutividade elétrica em função do tempo para um ensaio de eletrodialise com solução de ácido lactobiónico cristalizado (20g.L^{-1}) e corrente constante de 46mA.

A condutividade elétrica decresceu ao longo do tempo com 77% de redução, e a v_{mc} manteve-se próxima ao valor obtido anteriormente em $0,007\text{mS.cm}^{-1}.\text{min}^{-1}$.

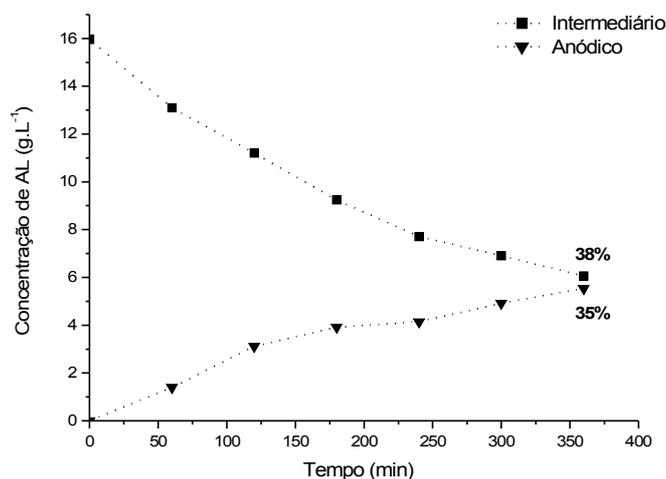


Figura 17: Concentração no compartimento intermediário e anódico em função do tempo para um ensaio de eletrodialise com solução de ácido lactobiónico cristalizado (20g.L^{-1}) e corrente constante de 46mA.

Na densidade de corrente utilizada ($4,2\text{mA.cm}^{-2}$), a eficiência de recuperação foi de 35% no compartimento anódico, enquanto a redução de concentração, após 360min, foi de

38% no compartimento de alimentação, confirmando que a condutividade pode ser utilizada para avaliação da eficiência do processo.

A variação da concentração de AL em função do tempo no compartimento de alimentação foi linear no início do ensaio. O coeficiente angular da reta representa a velocidade máxima de remoção (v_{mr}) do ácido lactobiônico ($\text{g.L}^{-1}.\text{min}^{-1}$). Conhecendo-se a área de membrana utilizada (11cm^2) e o volume da solução (120mL), é possível calcular o fluxo molar (N) de ácido lactobiônico permeado através da membrana ($\text{mmol.cm}^{-2}.\text{min}^{-1}$). O valor da v_{mr} foi de $0,037\text{g.L}^{-1}.\text{min}^{-1}$, resultando em um fluxo molar de $1,13.10^{-3}\text{mmol.cm}^{-2}.\text{min}^{-1}$.

4.3. Avaliação do sistema de eletrodialise com diferença de potencial constante

Os ensaios anteriores foram realizados em condições de corrente constante. A ddp elétrica aplicada variava ao longo do tempo. Com o aumento da ddp, há um aumento na resistência elétrica do sistema na interface da membrana, que pode ocasionar polarização por concentração, como consequência, uma menor eficiência na utilização da corrente (Ferraz, 1999; Arsand, 2001).

O efeito da aplicação de um potencial elétrico constante de 5, 15, 30 e 60V foi avaliado para uma solução de ALC 20g.L^{-1} . Observou-se a variação da condutividade elétrica ao longo de 250min (**Figura 18**) nos diferentes potencias.

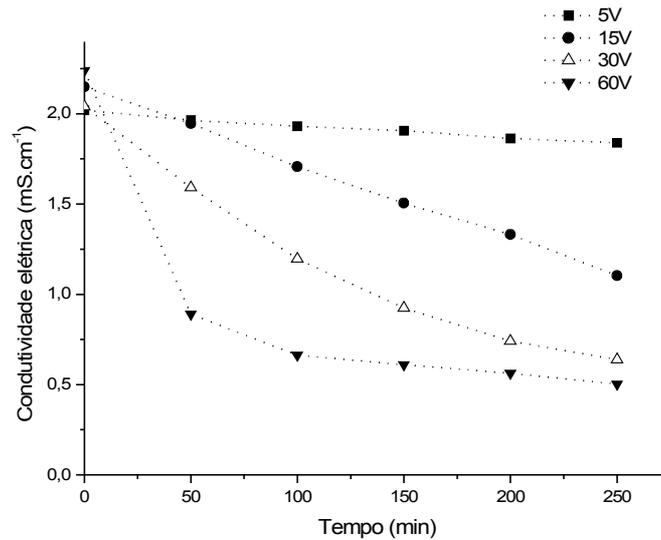


Figura 18: Condutividade elétrica da solução de ácido lactobiônico cristalizado (20g.L^{-1}) em função do tempo para um ensaio de eletrodialise com potencial constante de 5, 15, 30 e 60V.

Na **Tabela 2** é apresentada a recuperação do AL no compartimento anódico para o mesmo sistema.

Tabela 2: Concentração e recuperação de ácido lactobiônico (AL) no compartimento anódico em ensaio de eletrodialise com solução de ácido lactobiônico cristalizado (20g.L^{-1}) e diferença de potencial (ddp) constante de 5, 15, 30 e 60V.

Soluções	Concentração no compartimento anódico (g.L^{-1})		Recuperação (%)
	100min	250min	250min
5	0,79	1,95	11,6
15	2,73	6,53	38,7
30	2,32	4,87	29,2
60	1,87	4,63	26,9

Na **Figura 18** o comportamento da condutividade elétrica apresentou-se como o esperado, quanto maior a ddp, maior a variação e conseqüentemente maior a v_{mc} . No entanto, a recuperação de AL apresentou-se mais eficiente para a ddp de 15V com 38,7%. Para 5V a recuperação foi de 11,6%, para 30V foi de 29,2% e para 60V foi de 26,9%, após 250min de experimento.

O comportamento do sistema de ED operado com diferentes valores de concentração da solução inicial de ALC em relação à ddp (15, 30 e 60V) foi avaliado, com exceção à ddp de 5V, pois esta condição apresentou uma recuperação de AL pouco significativa. A relação entre a condutividade e a concentração da solução de ALC (1, 5, 10, 20 e 30g.L⁻¹) para uma ddp de 15V está apresentada na **Figura 19**.

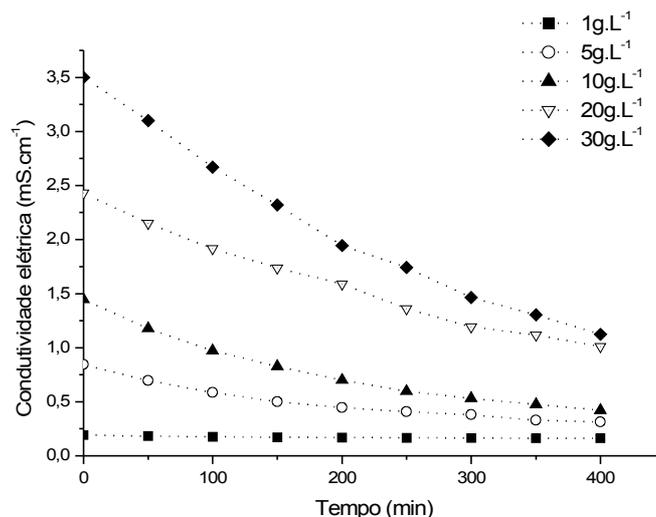


Figura 19: Condutividade elétrica da solução de ácido lactobiônico cristalizado nas concentrações 1, 5, 10, 20 e 30g.L⁻¹, em função do tempo para um ensaio de eletrodialise com potencial constante de 15V.

A condutividade decresceu ao longo do tempo e apresentou uma maior variação para as soluções mais concentradas com até 70% de redução na concentração de 30g.L⁻¹, possivelmente devido à maior quantidade de íons presentes na solução de maior concentração.

Na **Figura 20** é apresentada a relação entre a condutividade elétrica e a concentração da solução de ALC (1, 5, 10, 20 e 30g.L⁻¹) para uma ddp elétrica constante de 30V.

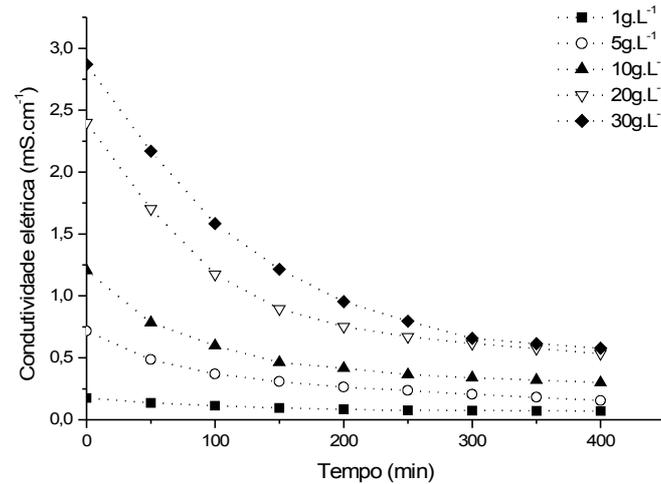


Figura 20: Condutividade elétrica da solução de ácido lactobiônico cristalizado nas concentrações 1, 5, 10, 20 e 30g.L⁻¹, em função do tempo para um ensaio de eletrodialise com potencial constante de 30V.

O comportamento do ensaio com ddp de 30V foi semelhante ao observado para uma ddp de 15V, com um decréscimo maior na variação da condutividade para as soluções de maior concentração. A redução na condutividade para a solução de 30g.L⁻¹ chegou a 80%.

Um ensaio de ED nas mesmas condições foi realizado para uma ddp constante de 60V (**Figura 21**).

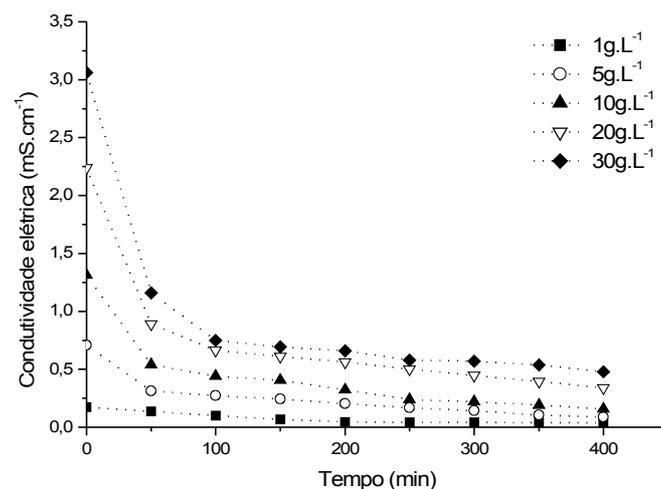


Figura 21: Condutividade elétrica da solução de ácido lactobiônico cristalizado nas concentrações 1, 5, 10, 20 e 30g.L⁻¹, em função do tempo para um ensaio de eletrodialise com potencial constante de 60V.

A redução na condutividade elétrica para a solução de ALC 30g.L^{-1} com ddp de 60V foi de 85%, apresentando um decréscimo acentuado nos primeiros 50min de ensaio. Este comportamento apresenta uma tendência precoce do sistema à estabilização, possivelmente, pelo aumento da velocidade de dissociação dos íons devido à aplicação de uma ddp muito elevada.

Os resultados deste grupo de ensaios (**Figuras 19, 20 e 21**) foram analisados com relação à variação da velocidade máxima de redução da condutividade (v_{mc}) em função da concentração inicial de ALC (**Figura 22**).

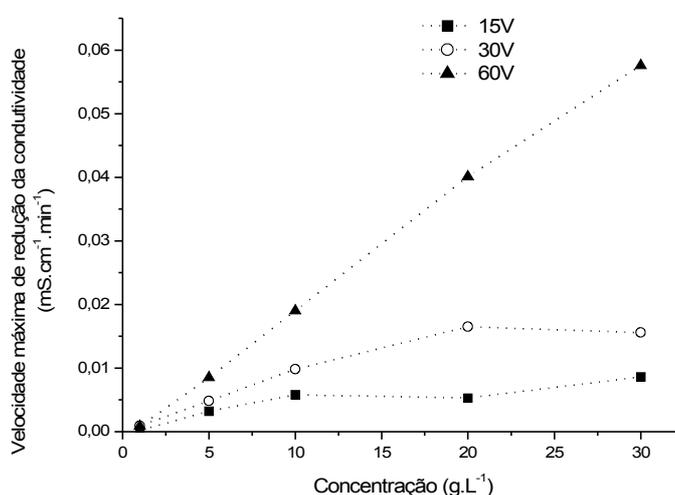


Figura 22: Velocidade máxima de redução da condutividade em função da concentração da solução de ácido lactobiônico cristalizado ($1, 5, 10, 20$ e 30g.L^{-1}) para um ensaio de eletrodialise com potencial aplicado de 15V em comparação a 30 e 60V.

A v_{mc} aumentou relativamente à ddp aplicada e à concentração da solução de AL. Para 15 e 30V, a v_{mc} manteve um comportamento semelhante, no entanto, para a ddp de 60V, a v_{mc} foi cerca de quatro vezes maior para a concentração de 30g.L^{-1} .

Na **Figura 23**, os dados anteriores são rerepresentados relacionando-se os potenciais testados (15, 30 e 60V) com a recuperação de ácido lactobiônico no compartimento anódico em 400min.

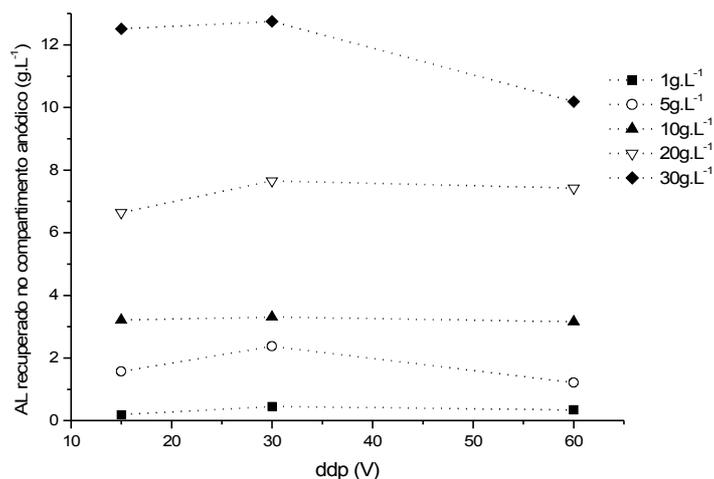


Figura 23: Ácido lactobiônico recuperado no compartimento anódico em função dos potenciais (15, 30 e 60V) para um ensaio de eletrodialise com uma solução de ácido lactobiônico cristalizado nas concentrações (1, 5, 10, 20 e 30g.L⁻¹) em 400min.

A condutivimetria subestimou os valores de concentração. A recuperação de AL foi, de um modo geral, semelhante para 15 e 30 e 60V. É possível que formas ionizáveis mais simples, como o NaCl, que tem maior mobilidade na passagem através da membrana, tenham influenciado no valor da v_{mc} .

Como citado anteriormente, em função da maior dissociação dos íons com a utilização de um potencial elétrico elevado, foi calculada a resistência elétrica aparente (R_{ap}) através da medida do potencial e da correspondente corrente elétrica do sistema em cada instante, através da relação entre potencial e corrente elétrica, segundo a equação ($R = V.I^{-1}$).

Na **Figura 24** estão apresentados os dados de resistência aparente do sistema de eletrodialise para a condição de potencial constante de 15V em comparação a 30 e 60V, sugerindo-se a utilização da ddp de 15V por oferecer uma menor resistência elétrica e menor gasto de energia ao sistema.

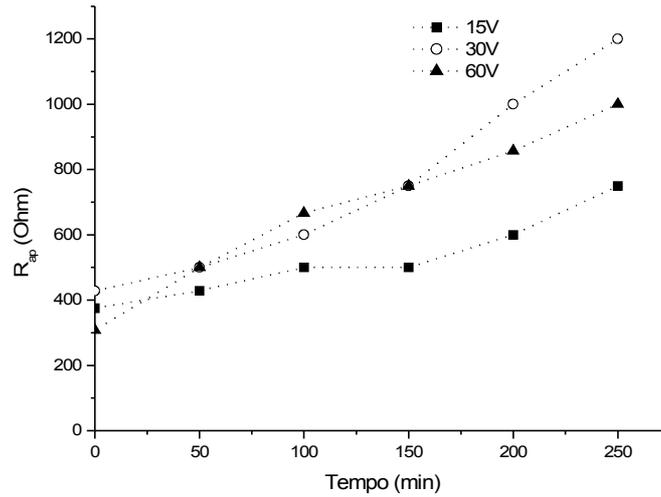


Figura 24: Resistência elétrica aparente do sistema de eletrodialise com solução de ácido lactobiônico 20g.L^{-1} , na condição de potencial constante de 15V em comparação a 30 e 60V.

Entretanto, comparou-se cineticamente a remoção de AL do compartimento intermediário (**Figura 25**) e a recuperação de AL no compartimento anódico (**Figura 26**) com uma solução de alimentação de ALC 20g.L^{-1} , para a ddp de 15 e 30V.

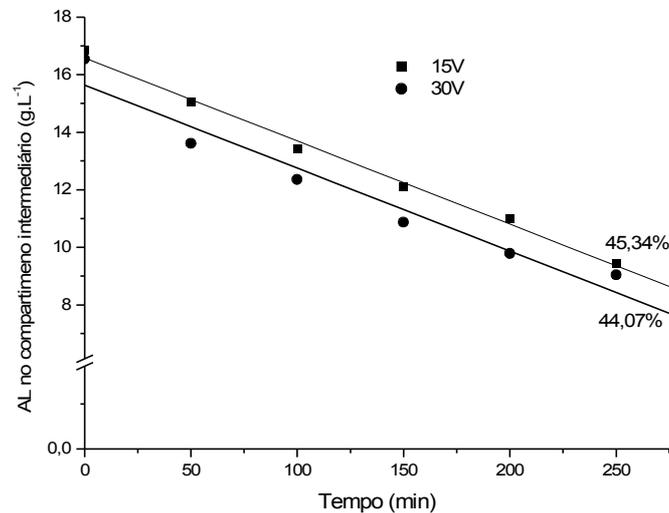


Figura 25: Ácido lactobiônico no compartimento intermediário em função do tempo para um ensaio de eletrodialise com uma solução de ácido lactobiônico cristalizado (20g.L^{-1}) e potencial constante de 15V e 30V.

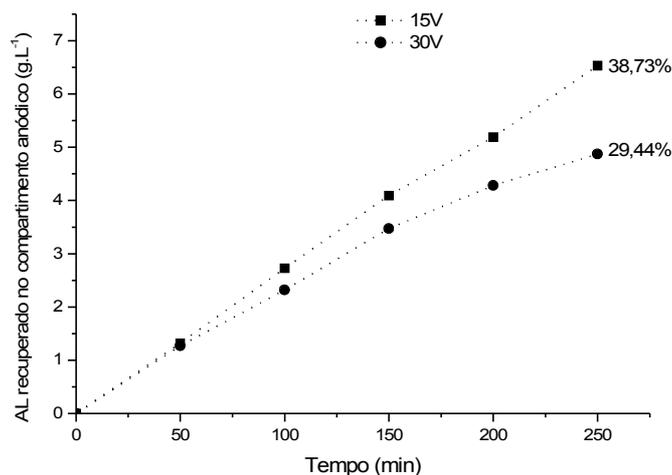


Figura 26: Ácido lactobiônico recuperado no compartimento anódico em função do tempo para um ensaio de eletrodialise com uma solução de ácido lactobiônico cristalizado (20g.L^{-1}) e potencial constante de 15V e 30V.

A remoção de AL do compartimento intermediário foi semelhante para os potenciais de 15 e 30V, com 44,07% e 45,34%, respectivamente, em 250min. Entretanto, a recuperação no compartimento anódico foi maior para ddp de 15V com 38,7%, enquanto para a ddp de 30V foi de 29,44%.

Como é mostrado na **Figura 25**, a redução na concentração de AL em função do tempo no compartimento de alimentação foi linear, com uma inclinação constante para ddp de 15 e 30V, resultando em uma v_{mr} e N constantes de $0,029\text{g.L}^{-1}.\text{min}^{-1}$ e $8,8.10^{-4}\text{mmol.cm}^{-2}.\text{min}^{-1}$. Ferraz (1999) estimou a v_{mr} do gliconato de sódio (25g.L^{-1}) na ddp de 30V em aproximadamente $0,28\text{g.L}^{-1}.\text{min}^{-1}$, resultando em um fluxo molar de $6,9.10^{-3}\text{mmol.cm}^{-2}.\text{min}^{-1}$, nove vezes maior que o fluxo de permeação do AL. Essa diferença pode estar associada à maior área de membrana (56cm^2) e ao fato de a molécula de gliconato de sódio (218g.mol^{-1}) ser menor que a de AL (358g.mol^{-1}) e, assim, possuir maior mobilidade em direção ao ânodo. Avaliando o transporte de ácido láctico (90g.mol^{-1}) através da membrana AMX (Neosepta) em sistema de ED, Madzingaidzo *et al.* (2002) determinaram o valor de fluxo em $5,6.10^{-3}\text{mmol.cm}^{-2}.\text{min}^{-1}$.

No presente trabalho utilizou-se o mesmo volume em todos os compartimentos e uma área de membrana de 11cm². Ferraz (1999), por sua vez, utilizou uma área de membrana cerca de cinco vezes maior e um compartimento anódico com um volume quase três vezes maior que o do compartimento de alimentação. Para testar a hipótese de que o fluxo de AL para o compartimento anódico estivesse sendo limitado pelo volume do compartimento anódico, foi realizado um novo ensaio em que o volume de solução dos compartimentos laterais era 2,5 vezes maior que o do sistema original (**Figura 27**).

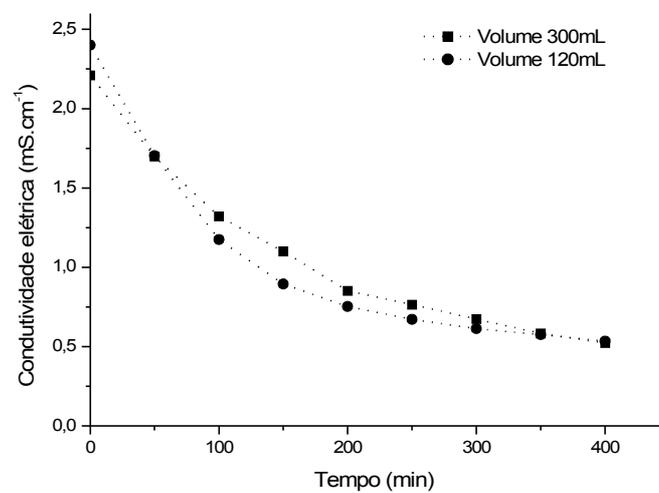


Figura 27: Condutividade elétrica em função do tempo para um ensaio de eletrodialise com uma solução de ácido lactobiônico cristalizado (20g.L⁻¹), potencial de 30V e com diferentes volumes do compartimento anódico (120 e 300mL).

A v_{mc} foi semelhante para ambos os sistemas. Para o sistema com volume de 120mL em todos os compartimentos, a v_{mc} foi de 0,012mS.cm⁻¹.min⁻¹ e com volume de 300mL nos compartimentos anódico e catódico a v_{mc} foi de 0,009mS.cm⁻¹.min⁻¹. Em 250min, a recuperação de AL no compartimento anódico para o sistema com volumes equivalentes foi de 38,7%, enquanto que para o sistema com alteração no volume dos compartimentos laterais a recuperação foi de 29,4%. Nessas condições, descarta-se a hipótese da influência do volume

dos compartimentos, pois a recuperação de AL mostrou-se menos eficiente para o sistema com 300mL.

4.4. Aplicação do sistema de eletrodialise na separação do ácido lactobiônico das demais substâncias presentes no processo de bioconversão

Como o objetivo principal desse trabalho é separar o AL produzido em processo biotecnológico com *Z. mobilis*, os ensaios que seguem apresentam os resultados de recuperação para soluções de ALC na presença das demais substâncias (sorbitol, lactose e frutose) que são encontradas no meio de bioconversão, procurando-se avaliar os efeitos que essas espécies não ionizáveis causariam no sistema de ED.

Na **Figura 28** é apresentada a condutividade para sistemas de ED com soluções de ALC e lactose, ALC e frutose, ALC e sorbitol e com todos os componentes da bioconversão, com 20g.L^{-1} de cada componente, em comparação com uma solução de ALC 20g.L^{-1} .

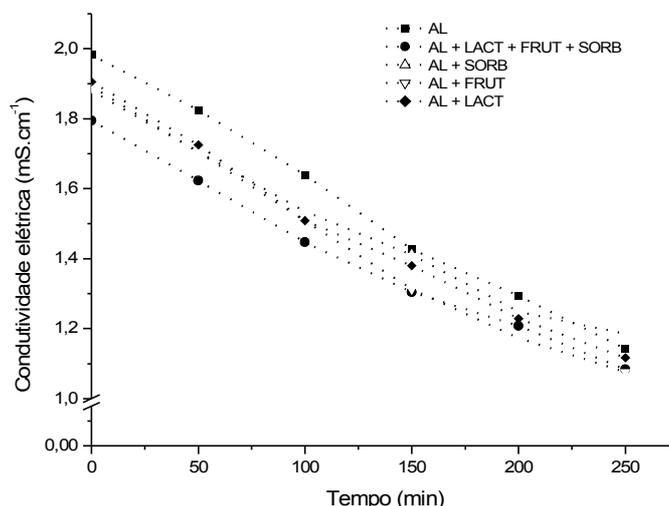


Figura 28: Condutividade elétrica em função do tempo para um ensaio de eletrodialise com solução de ácido lactobiônico cristalizado e lactose, ácido lactobiônico cristalizado e frutose, ácido lactobiônico cristalizado e sorbitol e com todos os componentes da bioconversão, todos 20g.L^{-1} , em comparação a uma solução de ácido lactobiônico cristalizado 20g.L^{-1} com potencial constante de 15V.

O comportamento da condutividade elétrica assemelha-se entre os sistemas, apresentando uma v_{mc} de aproximadamente $0,003\text{mS}\cdot\text{cm}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$.

A medida da condutividade não correspondeu ao valor concentração por apresentar mais de uma espécie, ainda que não iônica na solução. Na **Tabela 3** é apresentada a recuperação de AL no compartimento anódico para o mesmo ensaio.

Tabela 3: Ácido lactobiônico (AL) recuperado no compartimento anódico em um ensaio de eletrodialise com solução de ácido lactobiônico cristalizado (ALC) e lactose (LACT), ácido lactobiônico cristalizado e frutose (FRUT), ácido lactobiônico cristalizado e sorbitol (SORB) e com todos os componentes da bioconversão, na concentração de $20\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, em comparação a uma solução de ácido lactobiônico cristalizado $20\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ com potencial constante de 15V.

Soluções	Concentração no compartimento anódico ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)		Recuperação (%)
	100min	250min	250min
AL	1,60	4,59	26,30
AL + LACT	1,57	4,06	24,4
AL + FRUT	1,50	4,20	24,05
AL + SORB	1,53	3,09	17,60
AL + LACT + FRUT + SORB	1,18	2,57	16,15

A remoção de AL é afetada pela presença dos componentes não iônicos. Para o sistema simples a recuperação de ácido lactobiônico foi de 26,3%. Para solução de AL e frutose e AL e lactose a recuperação foi aproximadamente 24%. No sistema com solução de AL e sorbitol a recuperação foi de 17,6% e para o sistema com todos os componentes da bioconversão a recuperação foi de 16,15%.

Resultados semelhantes foram apresentados por Ferraz (1999) em soluções contendo gliconato de sódio, glicose, frutose e sorbitol ($25\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$), que atribuiu a redução de quase duas vezes observada para o fluxo de gliconato de sódio em sistema operado a 15V, ao aumento da viscosidade da solução. Entretanto, como a influência da concentração das soluções utilizadas na viscosidade não foi tão alta, outra hipótese pode ser avaliada. É possível que os componentes não iônicos (sorbitol, lactose e frutose), que não competem na passagem através da membrana por não possuírem carga elétrica, tenham interferido no sistema transmembrana por estarem dissolvidos no meio e promoverem colisões.

Como descrito nos itens **3.1.3** e **3.1.4**, o processo de bioprodução do ácido lactobiônico consiste de quatro etapas: produção de células de *Z. mobilis* com alta atividade enzimática (GFOR/GL), concentração das células contendo as enzimas, permeabilização e imobilização e biotransformação de lactose e frutose ($0,7\text{mol.L}^{-1}$) em ácido lactobiônico e sorbitol, respectivamente. Os ensaios seguintes foram realizados utilizando os produtos obtidos em ensaios de bioconversão.

Os primeiros ensaios de ED foram realizados alimentando-se diretamente o meio de bioconversão no compartimento de alimentação do sistema para detectar os possíveis problemas do processo de separação em batelada. Os resultados foram pouco satisfatórios na separação do AL (recuperação inferior a 3%). Um dos fatores que pode ter influenciado negativamente foi a alta viscosidade da solução de alimentação. No final da bioconversão a concentração dos produtos foi de aproximadamente 200g.L^{-1} o que tornou a solução excessivamente viscosa e de difícil mobilidade através da membrana, podendo ainda resultar em *fouling*. Outro provável interferente foram as impurezas do meio, que poderiam ser removidas com um pré-tratamento por microfiltração.

Assim, um novo ensaio foi realizado no qual o meio de bioconversão de 72h com aproximadamente 165g.L^{-1} de ALC, foi previamente diluído com água deionizada (1:10) e submetido à microfiltração com sistema Millipore e membrana de acetato de celulose Sartorius com poros de $0,45\mu\text{m}$, com o intuito de remover as impurezas do meio. Os resultados de condutividade e concentração no compartimento anódico, para o ensaio de 300min e diferença de potencial constante de 15V, estão apresentados nas **Figuras 29 e 30**.

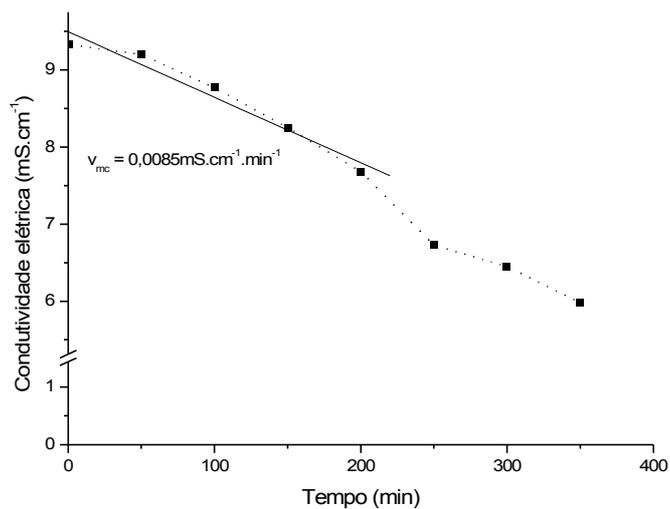


Figura 29: Condutividade elétrica em função do tempo para um ensaio de eletrodialise com meio de bioconversão (165g.L^{-1}) e potencial constante de 15V em 350min.

A condutividade apresentou um comportamento decrescente com o tempo, com v_{mc} de $0,0085\text{mS.cm}^{-1}.\text{min}^{-1}$. Em comparação aos sistemas anteriores, o decréscimo da condutividade nos primeiros 250min foi menos acentuado, não demonstrando tendência à estabilização.

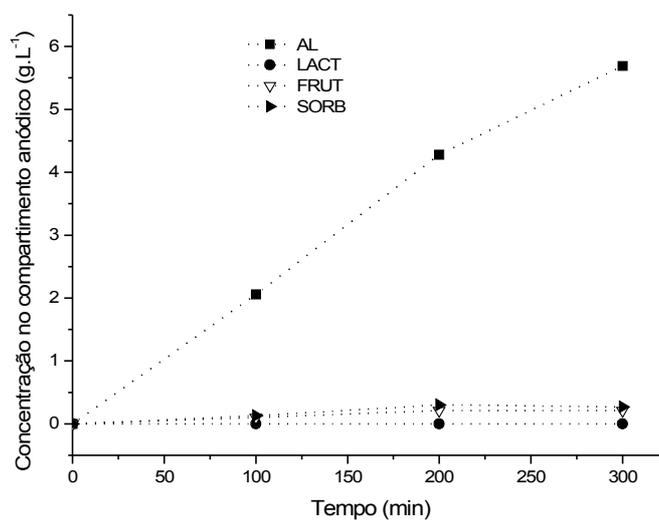


Figura 30: Concentração de ácido lactobiônico, lactose, frutose e sorbitol no compartimento anódico em função do tempo para um ensaio de eletrodialise com bioconversão (165g.L^{-1}) e potencial constante de 15V em 350min.

Como mostra a **Figura 30**, com 250min de ensaio obteve-se uma recuperação de ácido lactobiônico de 14% no compartimento anódico. Ainda que a recuperação tenha apresentado uma eficiência baixa, em razão das limitações do sistema, como área permeante da membrana e tempo de ensaio, é interessante ressaltar a especificidade da recuperação em relação aos demais componentes da bioconversão que apresentaram-se praticamente inalterados no compartimento anódico.

É possível, que a diluição da solução tenha promovido a dispersão dos componentes não iônicos que ofereceriam resistência ao transporte transmembrana. Além disso, a utilização do processo de microfiltração foi eficiente na remoção das impurezas que interferiam no sistema. Na literatura diversos trabalhos mencionam a utilização de pré-tratamentos para bioprodutos de processos fermentativos, facilitando o processo de eletrodialise e melhorando a qualidade do produto final. Reimann (2006) cita o uso de sucessivos passos para obtenção do ácido láctico purificado: ultrafiltração, eluição em resina de troca iônica, eletrodialise com membrana monopolar e com membrana bipolar e evaporação. Segundo o autor, o número de passos influencia fortemente na qualidade e no custo do produto final. Com esta afirmação, torna-se justificável a utilização de tecnologias limpas e processos de pré e pós-tratamentos para o ácido lactobiônico, já que o valor do produto, com 97% de pureza, é de aproximadamente U\$ 200/kg, não incluídos os custos de importação.

5. CONCLUSÕES

A partir dos resultados alcançados neste trabalho, podem ser relacionadas as conclusões relacionadas a seguir.

- A velocidade máxima de redução da condutividade (v_{mc}) foi maior para o gliconato de sódio em comparação ao ácido lactobiônico cristalizado (ALC), possivelmente por apresentar uma estrutura molecular menor, facilitando a mobilidade através da membrana.
- Sob intensidade de corrente constante, a recuperação de AL presente em uma solução padrão de ALC (20g.L^{-1}) foi de 60%, em 800min, observando-se forte declínio da velocidade a partir de aproximadamente 250min. Nestas condições, a ddp aplicada cresceu ao longo do tempo, resultando em aumento na resistência elétrica do sistema.
- Sob ddp constante, a v_{mc} aumentou com o valor de ddp aplicado (5, 15, 30 e 60V). No entanto, a recuperação de AL foi maior para a ddp de 15V, com 38,7%, em comparação ao ensaio realizado a 30V com 29,4%. Estes resultados mostram que a avaliação por condutivimetria subestima os valores de concentração para o sistema operado com diferentes valores de ddp.
- A variação da concentração de ALC em função do tempo no compartimento de alimentação do sistema de ED, para os potenciais de 15 e 30V, resultou em uma velocidade máxima de remoção e fluxo constantes de $0,029\text{g.L}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ e $8,8\cdot 10^{-4}\text{mmol}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{min}^{-1}$, comparáveis com a literatura para o transporte de ácido láctico e gliconato de sódio.
- A presença de componentes não iônicos no sistema influenciou negativamente o transporte transmembrana, diminuindo a velocidade máxima de redução da condutividade e a recuperação de AL. Para o sistema simples, a recuperação de AL foi de 26,3%,

enquanto que para soluções de ALC e frutose e ALC e lactose a recuperação foi aproximadamente 24%. No sistema com solução de ALC e sorbitol, a recuperação foi de 17,6% e para o sistema com todos os componentes que estariam presentes no processo de bioconversão a recuperação foi de 16,15%.

- Comportamento semelhante foi observado quando o sistema de ED foi alimentado com o meio reacional real do processo biotecnológico, observando-se um efeito negativo causado pelas impurezas do bioprocessamento, que foi minimizado pela utilização de pré-tratamento em sistema de microfiltração.

Para a continuação deste trabalho, prevê-se a realização de estudos envolvendo a:

- separação por ED de ácido lactobiônico presente em meios de bioconversão após pré-tratamentos em sistemas de micro ou ultrafiltração;
- separação por ED de ácido lactobiônico simultaneamente ao bioprocessamento de produção;
- avaliação do acoplamento dos sistemas de ED e cromatografia em fase líquida para a recuperação de todos os produtos e substratos do processo.

6. REFERÊNCIAS

Altmeier, P., Bolz, H., Schwitzgebel, G. (1997). New Anion Exchange Membranes for the Electrodialytic Treatment of Acids. Eleventh **International Forum** on Electrolysis in the Chemical Industry. Clearwater, FL.

Arsand, D. R. (2001). Recuperação de Águas de Lavagem do Processo de Fosfatização por Eletrodiálise. **Dissertação de Mestrado em Engenharia Química**. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, RS.

Bobreshova, O., Novikova, L., Kulintsov, P., Balavadze, E. (2002). Amino acids and water electrotransport through cation-exchange membranes. International Congress on Membranes and Membranes Processes. **Desalination**. Vol. 6. 149:363-368. Toulouse, July 2002.

Calle, E. V., Ruales, J., Dornier, M., Sandeaux, J., Sandeaux, R., Pourcelly, G. (2002). Deacidification of the clarified passion fruit juice (*P. edulis* f. *flavicarpa*). International Congress on Membranes and Membranes Processes. **Desalination**. Vol. 6. 149:357-361. Toulouse, July 2002.

Carra, S., Concatto, K., Malvessi, E., Silveira, M. M. (2003). Cinética da Ação de Glucose-Frutose Oxidorredutase e glucono- δ -lactonase de *Zymomonas mobilis* na Presença de Diferentes Carboidratos. 14^o Simpósio Nacional de Fermentações. **Anais**. Florianópolis, Brasil, 2003.

Carra, S., Concatto, Pasquali F. C. K., Malvessi, E., Silveira, M. M. (2005). Bioconversão de Carboidratos em Sorbitol e Ácidos Orgânicos por Enzimas Periplasmáticas de *Zymomonas mobilis*. XV Simpósio Nacional de Bioprocessos. **Anais**. Recife, 2005.

Chukwu, U. N., Cheryan, M. (1999). Electrodialysis of acetate fermentation broths. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. 77-79, 485-499.

Chun, U. H., Rogers, P. L. (1988). The simultaneous production of sorbitol and gluconic acid by *Zymomonas mobilis*. **Applied Microbiology and Biotechnology**. 29:19-24.

Dalla Costa, R. F. (1996). Emprego da Técnica de Eletrodiálise na Remoção e Concentração de Cromo em Solução Aquosa Ácida. **Dissertação de Mestrado em Engenharia Química**. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, RS.

Elisseeva, T. V., Shaposhnik, V. A., Luschik, I. G. (2002). Demineralization and separation of amino acids by electrodialysis with ion-exchange membranes. International Congress on Membranes and Membranes Processes. **Desalination**. 149:405-409.

Erzinger, G. S., Silveira M. M., Costa, J. P. L., Vitolo, M., Jonas, R. (1996). Determination of glucose-fructose oxidoreductase activity in whole cells of *Zymomonas mobilis*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. 12:24-27.

Erzinger, G. S. (1999). Produção biotecnológica de sorbitol e ácido glucônico por *Zymomonas mobilis* ATCC 29191: estudo da estabilidade da enzima glicose-frutose oxidorreductase. Tese de Doutorado, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, USP, Brasil.

Erzinger, G. S., Silveira M. M., Costa, J. P. L., Vitolo, M., Jonas, R. (2003). Activity of glucose-fructose oxidoreductase in fresh and permeabilised cells of *Zymomonas mobilis* grown in different glucose concentrations. **Brazilian Journal of Microbiology**. 34:329-333.

Ferraz, H. C. (1999). Produção de Sorbitol e Ácido Glicônico por Células Permeabilizadas e Imobilizadas de *Zymomonas mobilis* e Separação Simultânea dos Produtos por ED. **Dissertação de Mestrado em Engenharia Química**. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, RJ.

Ferraz, H. C., Borges, C. P., Alvez, T. L. (2001). Coupling of an electrodialysis unit to a hollow fiber bioreactor for separation of glucônico acid from sorbitol produced by *Zymomonas mobilis* permeabilized cells. **Journal of Membrane Science**. 191: 43-51.

Grimes, P. E.; Green, B. A.; Wildnauer, R. H.; Edison, B. L. (2004). **Cutis**. 73(2):3-13.

Hayes, T. (2004). The electrodialysis alternative for produced water management. Gas Technology Institute (TIPS). **Summer**. 10(3):15-20.

Hardman M. J., Scopes R. K. (1988). The kinetics of glucose-fructose oxidorreductase from *Zymomonas mobilis*. **European Journal of Biochemistry**. 173: 203-209.

Heimoff, S. (1996). Electrodialysis removes crystals. Wine Business Monthly. May, 1996. **Disponível**

(online). <http://www.winebusiness.com/Archives/Monthly/1996/9605/bm059612.htm> (30 de outubro).

Hongo M., Nomura Y., Iwahara M. (1986). Novel Method of Lactic Acid Production by Electrolysis Fermentation. **Applied and Environmental Microbiology**. 52:314-319.

Kansai Window (2002). Method of mass-producing lactobionic acid developed. Vol.8 N°366, February, 2002. **Disponível (online)**. <http://www.kippo.or.jp/KansaiWindowHtml/News/2002> (15 de julho).

Leigh, D.; Scopes, R. K., Rogers, P. L. (1984). A proposed pathway for sorbitol production by *Zymomonas mobilis*. **Applied Microbiology and Biotechnology**. 20: 413-415.

Li, S., Fritz, J. S. (2002). Organic modifiers for the separation of organic acids and bases by liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**. 964:91-98.

Madzingaidzo, L., Danner, H., Braun, R. (2002). Process development and optimization of lactic acid purification using electrolysis. **Journal of Biotechnology**. 96:223-239.

Maldonado J. (1991). **Instituto Nacional de Tecnologia**. Coordenação de Programas de Tecnologia dos Materiais. Divisão de Estudo e Prospecção em Materiais. Membranas e Processos de Separação. DEPM/CTM/INT, maio 1991.

Malvessi, E., Concato, K., Silveira, M. M. (2002). Avaliação de diferentes aldoses como co-substratos para a produção de ácidos orgânicos por *Zymomonas mobilis*. 5º Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática. **Anais**. Brasília, DF.

Malvessi, E., Concato, K., Carra, S., Silveira M. M. (2006). Formulation of medium for growth and production of ethanol and intracellular enzymes by *Zymomonas mobilis*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**. 49:139-144.

Novalic, S., Kongbangkerd, T., Kulbe, K. D. (1997) Separation of gluconate with conventional and bipolar electrolysis. **Journal of Membrane Science**. 166: 45-50.

Novalic, S., Kongbangkerd, T., Kulbe, K. D (2000). Recovery of organic acids with high molecular weight using a combined electrolytic process. **Journal of Membrane Science**. 114: 99-104.

Pedruzzi, I., Rodrigues, A. E. (2006). Biotechnology production of sorbitol and lactobionic acid with continuous separation in simulated moving bed (SMB) system. **Disponível (online)**. <http://www.lsre.fe.up.pt> (14 de novembro).

Pérez, V. R., Rodríguez, L. M., Mengual, I. A. (2001). Characterizing an electro dialysis reversal pilot plant. **Desalination**. 137:199-206.

Pinacci, P., Radaelli, M. (2002). Recovery of citric acid from fermentation broths by electro dialysis with bipolar membranes. **Desalination**. 148:177-179.

Porter, M., C. (1990). **Handbook of Industrial Membrane Technology**. Noyes Publications, New Jersey.

Poulin, J. F., Amiot, J., Bazinet, L. (2005). Simultaneous separation of acid and basic bioactive peptides by electro dialysis with ultrafiltration membrane. **Journal of Biotechnology**. 123:314-328.

Reimann, W. (2005). Down Streaming of Lactic Acid from Hydrolysate of Barley after Fermentation. **Agricultural Engineering International: the CIGRE Journal**. VIII:1-15.

Rautenbach, R., Albrecht, R. (1989). **Membrane Processes**. John Wiley & Sons Ltda.

Rehr, B., Wilhelm, C., Sahm, H. (1991). Production of sorbitol and gluconic acid by permeabilized cells of *Zymomonas mobilis*. **Applied Microbiology and Biotechnology**. 35:144-148.

Roux-de Balmain, H., Bailly, M., Lutin, F., Aimar, P. (2002). Modelling of the conversion of weak organic acids by bipolar membrane electro dialysis. **Desalination**. 149:399-404.

Satory, M., Fuerlinger, M., Haltrich, D., Kulbe, K.D., Pittner, F., Nidetzky, B. (1997). Continuous enzymatic production of lactobionic acid using glucose-fructose oxidoreductase in an ultrafiltration membrane reactor. **Biotechnology Letters**. 19:1205-1208.

Scott, K., (1995) **Handbook of Industrial Membranes**. Elsevier, Oxford-UK, 1st edition.

Silveira, M. M., Wisbeck, E., Lemmel, C., Erzinger, G. S., Lopes da Costa J. P., Bertasso, M., Jonas, R. (1999). Bioconversion of glucose and fructose to sorbitol and gluconic acid by untreated cells of *Zymomonas mobilis*. **Journal of Biotechnology**. 75:99-103.

Silveira, M. M.; Jonas, R. (2002) The biotechnological production of sorbitol. **Applied Microbiology and Biotechnology**. 59: 400-408.

Silveira, M. M. (2003). **Relatório Técnico de Projeto** “Produção de Sorbitol e Ácidos Orgânicos por *Zymomonas mobilis*”. Universidade de Caxias do Sul, RS.

Simms, P. J., Hicks, K. B., Haines, R. M., Hotchkiss, A. T., Osman, S. F. (1994). Separation of lactose, lactobionico acid and lactobionolactone by high-performance liquid chromatography. **Journal of Cromatography**. 667:67-73.

Strathmann H. (2001). Electrodialysis. In: Winston Ho, W. S., Sirkar, K. K.. Kluwer. **Membrane Handbook** Academic Publishers, Boston/Dordrecht/London. V:219-255.

Sumimoto, R., Kamada, N. (1990). **Transplantation Proceedings**. 2198-2199.

Van der Ent, E. M., Van Hee, P., Keurentjes, J. T. F., Van't Riet, K., Van der Padt, A. (2002). Multistage electrodialysis for large-scale separation of racemic mixtures. **Journal of Membrane Science**. 204:173-184.

Viikari, L. (1984). Formation of levan and sorbitol from sucrose by *Zymomonas mobilis*. **Applied Microbiology and Biotechnology**. 19:252-255.

Zachariou, M. & Scopes, R. K. (1986). Glucose-Fructose Oxidoreductase, a New Enzyme Isolated from *Zymomonas mobilis* that is responsible for sorbitol production. **Journal of Bacteriology**. 3:863-869.

Anexo

Definição do método de determinação de ácido lactobiônico, sorbitol, lactose e frutose por cromatografia em fase líquida (HPLC)

Na literatura, a eficiência da cromatografia em fase líquida (HPLC) tem sido estudada na separação e na quantificação de carboidratos e alguns ácidos orgânicos. Simms *et al.* (1994) demonstraram a completa separação de lactose, ácido lactobiônico e lactobionolactona, utilizando uma coluna Cyclobond I. Li & Fritz (2002) separaram ácidos orgânicos e bases por cromatografia líquida utilizando modificadores orgânicos, buscando melhores condições de separação. A coluna utilizada para separação de ácidos orgânicos foi Supelcosil LC-18 e para separação das bases a coluna foi preparada em laboratório usando uma resina macroporosa (Transgenomic CA, USA). Novalic *et al.* (2000) relatam a determinação da concentração de ácido glicônico por HPLC, utilizando a coluna AMINEX HPX 87H (Bio-Rad Labs, CA, USA), porém não foram referidas as condições analíticas de utilização da coluna.

Neste trabalho, os testes visando a definição das condições de análise com a coluna AMINEX HPX 87H (Bio-Rad Labs, CA, USA) foram conduzidos levando-se em consideração as especificações fornecidas pelo fabricante. Com base nestas informações, algumas variações foram analisadas, como o uso de diferentes concentrações da fase móvel (solução aquosa de H_2SO_4), de vazão do eluente e temperaturas de análise. Os ensaios foram realizados com amostras de soluções de lactose, frutose, sorbitol e ácido lactobiônico, grau p.a., na concentração de $10g.L^{-1}$.

A Tabela A₁ apresenta as recomendações do fabricante e as condições de otimização da análise, para vazão constante e concentração da fase móvel variável. As variações na concentração da fase móvel foram realizadas, atentando ao valor resultante do pH e pressão

(1.500psi ou 103bar), que deve estar dentro da faixa de operação da coluna, para não comprometer a eficiência analítica da mesma.

Tabela A₁: Recomendações do fabricante para coluna AMINEX HPX 87H e variações na concentração da fase móvel.

Condições típicas de operação da coluna AMINEX HPX 87H			
Fase móvel típica 5mmol.L ⁻¹ de H ₂ SO ₄	Temperatura (°C) até 65°C	Vazão (mL.min ⁻¹) -	pH faixa 1 - 3
Condições de otimização da análise			
Fase móvel (mmol.L ⁻¹ de H ₂ SO ₄)	Temperatura (°C)	Vazão (mL.min ⁻¹)	pH
5	30	0,55	1,9
12,5	30	0,55	1,7
0,5	30	0,55	2,8

Para as três concentrações testadas para a fase móvel, houve a sobreposição dos picos, principalmente entre os pares, lactose/ácido lactobiônico, e frutose/sorbitol, que possuem tempos de retenção muito próximos. Houve uma melhora sensível para a fase móvel de H₂SO₄0,5mmol.L⁻¹.

Nos testes seguintes manteve-se constante a concentração da fase móvel em 0,5mmol.L⁻¹ de H₂SO₄ e variou-se a vazão. O efeito da temperatura também foi avaliado.

Tabela A₂: Variações de temperatura e vazão para coluna AMINEX HPX 87H.

Condição	Fase móvel (mmol.L ⁻¹ de H ₂ SO ₄)	Temperatura (°C)	Vazão (mL.min ⁻¹)	pH
1	0,5	30	0,55	2,8
2	0,5	60	0,55	2,8
3	0,5	60	0,7	2,8
4	0,5	60	0,6	2,8

Observou-se que com o aumento da vazão da fase móvel houve uma redução no tempo de retenção das amostras. Para a lactose, por exemplo, o tempo de retenção para a vazão de 0,55; 0,6 e 0,7mL.min⁻¹ foi respectivamente de 8,32min; 7,64min e 6,56min. Essa redução no tempo retenção resultou em picos com melhor definição. Comparando-se as condições 1 e 2 da Tabela A₂ acima, houve uma melhora significativa na separação com o aumento da temperatura para 60°C.

Optou-se por utilizar o vazão de $0,6\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ de H_2SO_4 $0,5\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ por resultar em uma menor pressão para o sistema (61bar) e temperatura de 60°C , pois já se encontrava próxima à condição limite de operação. Nessas condições não houve a separação completa dos componentes, de modo que, para a quantificação dos componentes da mistura optou-se por utilizar as alturas dos picos, que apresentavam boa simetria, e não a integração das áreas sob as curvas. A figura abaixo apresenta o cromatograma de separação do ácido lactobiônico, lactose, frutose e sorbitol, nas melhores condições definidas para esse sistema.

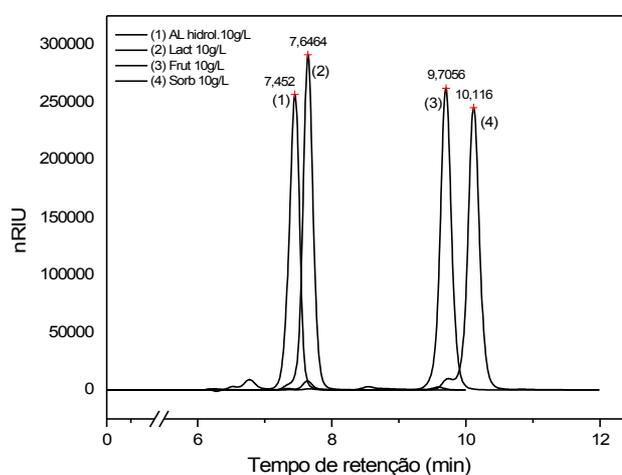


Figura A₁: Separação por HPLC do ácido lactobiônico comercial hidrolisado, lactose, frutose e sorbitol ($10\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) com uma coluna AMINEX HP 87H, vazão de $0,6\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$, 60°C e fase móvel de $0,5\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ de H_2SO_4 .

Com a determinação da melhor condição de utilização da coluna realizou-se a calibração do equipamento. Foram utilizadas soluções padrão p.a. de lactose, frutose, sorbitol e ácido lactobiônico. O ácido lactobiônico comercial da marca Acros Organics apresentou no cromatograma um pico duplo, anterior ao pico característico do ácido lactobiônico. A figura seguinte apresenta a análise feita com o ácido lactobiônico comercial hidrolisado e não hidrolisado.

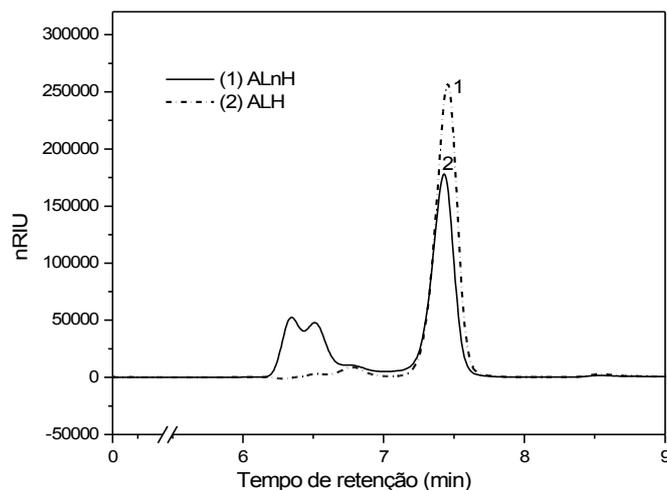


Figura A₂: Separação por HPLC do ácido lactobiônico comercial hidrolisado em comparação ao ácido lactobiônico comercial não hidrolisado (10g.L⁻¹) com uma coluna AMINEX HP 87H, vazão de 0,6mL.min⁻¹, 60°C e fase móvel de 0,05mmol.L⁻¹ de H₂SO₄.

Possivelmente o produto comercial apresentava-se, em parte, na forma de lactona. Para a remoção desse pico realizou-se uma hidrólise alcalina, elevando-se o pH da solução com NaOH, a um valor entre 11 e 12. Após a hidrólise, o pH da solução foi ajustado novamente para 2-3 com o eluente (H₂SO₄).

Posteriormente, ácido lactobiônico com grau de pureza acima de 99%, foi produzido por bioprocesso com a bactéria *Zymomonas mobilis*, cristalizado e purificado no Laboratório de Processos Biotecnológicos 2 do IB/UCS, passando a ser utilizado como padrão para a cromatografia.